

Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION IM FACH BIOLOGIE

Tumorantigen gepulste dendritische Zellen
zur Steigerung der Zytotoxizität
immunologischer Effektorzellen bei
Tumoren des gastroenteropankreatischen
Systems

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Dipl.-Ing. (FH) Angela Märten,
geboren am 20.03.1968 in Berlin

Dekan Prof. Dr. Jürgen P. Rabe

Gutachter: 1.Prof. Dr. R. Lucius
2.Prof. Dr. I. Schmidt-Wolf
3.Prof. Dr. D. Huhn
eingereicht: 01.02.2000
Datum der Promotion: 31.05.2000

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
WIDMUNG	IV
DANKSAGUNG	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DENDRITISCHE ZELLEN	2
1.2 IMMUNOLOGISCHE EFFEKTORZELLEN	4
1.3 TUMORE DES GASTROENTEROPANKREATISCHEN SYSTEMS	5
1.4 TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE	6
1.5 GENTRANSFER IN DENDRITISCHE ZELLEN	7
1.6 CIITA	8
2 ZIELSETZUNG	9
3 MATERIAL UND METHODEN	10
3.1 MATERIAL	10
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	10
3.1.2 Zytokine und Stimulanzen	10
3.1.3 Antikörper	11
3.1.4 Zelllinien	12
3.1.5 Bakterien, Plasmide, Primer	12
3.1.6 Lösungen und Puffer	13
3.1.7 Kulturmedien	13
3.2 METHODEN	14
3.2.1 Zellkultur	14
3.2.1.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen	14
3.2.1.2 Herstellung von CIK-Zellen	14
3.2.1.3 Generierung und Pulsen von dendritischen Zellen	15
3.2.1.4 Kokultivierung von CIK-Zellen mit dendritischen Zellen	15
3.2.1.5 Einzelzellisolierung von Tumorzellen	15
3.2.2 Molekularbiologische Techniken	15
3.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	15
3.2.2.2 Transformation von Bakterien	16
3.2.2.3 Gentransfer in dendritische Zellen	16
3.2.2.4 Plasmidherstellung	16
3.2.2.5 RNA-Isolierung	16
3.2.2.6 RT-PCR	17
3.2.2.7 Gel-Elektrophorese	17
3.2.3 Analytik	17
3.2.3.1 Zytotoxizitätsnachweis	17
3.2.3.2 Durchflußzytometrie	18
3.2.3.3 Dimeruntersuchungen	18
3.2.3.4 ELISpot-Analytik	18
3.2.3.5 Nachweis transfizierter Zellen	19
3.2.3.6 Tumormarkerbestimmung	19
4 ERGEBNISSE	20
4.1 GENERIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN	20
4.1.1 Durchflußzytometrische Untersuchung dendritischer Zellen	20
4.2 ZYTOTOXIZITÄT IMMUNOLOGISCHER EFFEKTORZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN	22
4.2.1 Bestimmung der Tumorantigenexpression der Targetzellen	22
4.2.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen zum Pulsen von dendritischen Zellen mit CA 19-9	22
4.2.3 Titration von CA 19-9 Protein	23
4.2.4 Pulsen von dendritischen Zellen mit CEA-Protein und CEA-Peptid (CAP-1)	24
4.2.5 Antikörperblockade von Tumorantigenen auf den Targetzellen	25

4.3	EINFLUß TUMORMARKERHALTIGEN SERUMS VON KARZINOMPATIENTEN BEI DER KULTIVIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT COKULTIVierter CIK-ZELLEN	27
4.3.1	Kultivierung dendritischer Zellen mit Seren von Patienten mit erhöhtem Tumormarkerspiegel	27
4.3.2	Titration tumormarkerhaltigen Patientenserums	28
4.3.3	Einfluß der Serumhitzeinaktivierung	28
4.3.4	Pulsen von dendritischen Zellen mit definierten Tumormarkerkonzentrationen, enthalten im Serum von Karzinompatienten	29
4.3.5	Kultivierung in tumormarkerhaltigen Serum und zusätzliches Pulsen mit exogenem Protein	30
4.4	EINSATZ IMMUNOLOGISCHER EFFEKTORZELLEN VON PATIENTEN MIT KOLOREKTALEN TUMOREN IM ZYTOTOXIZITÄTSASSAY GEGEN AUTOLOGE TUMORZELLEN	32
4.4.1	Immunologische Zellen von Patienten mit erhöhtem CA 19-9 Spiegel	32
4.4.2	Immunologische Zellen von Patienten mit erhöhtem CEA Spiegel	33
4.5	PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE VERÄNDERUNGEN VON CIK-ZELLEN DURCH DIE COKULTIVIERUNG MIT DENDRITISCHEN ZELLEN	34
4.5.1	Expression von T-Zellmarkern auf CIK-Zellen	34
4.5.2	Blockade von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen	34
4.5.3	Durchflußzytometrische Daten zur T-Zellrezeptorspezifität cokultivierter CIK-Zellen	35
4.5.4	Nachweis IFN- γ produzierender CIK-Zellen mittels der ELISpot-Technik	37
4.6	TRANSFEKTION DENDRITISCHER ZELLEN MIT DEM CIITA-GEN	39
4.6.1	Integrinexpression auf dendritischen Zellen	39
4.6.2	Effizienz der Transfektion dendritischer Zellen mit Poly-L-Lysin (AdV-PLL) gekoppeltem Adenovirus	39
4.6.3	Nachweis von CIITA-RNA mittels RT-PCR	40
4.6.4	Expression von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen nach Transfektion mit dem CIITA-Gen	41
4.6.5	Zytotoxizität von CIK-Zellen nach Cokultivierung mit CIITA-transfizierten dendritischen Zellen	42
5	DISKUSSION	44
5.1	ETABLIERUNG DES MODELLS	44
5.2	GEPULSTE DENDRITISCHE ZELLEN ZUR STEIGERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT IMMUNOLOGISCHER EFFEKTORZELLEN	45
5.2.1	Pulsen dendritischer Zellen mit CA 19-9	45
5.2.2	Pulsen von dendritischen Zellen mit CEA-Protein und CAP-1	46
5.2.3	Kultivierung dendritischer Zellen mit tumormarkerhaltigem Serum von Patienten mit Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems	46
5.2.4	Immunologische Zellen von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren	47
5.2.5	Zusammenfassung: Pulsen dendritischer Zellen	47
5.3	VERÄNDERUNGEN DER OBERFLÄCHENMERKMALE VON CIK-ZELLEN DURCH DIE COKULTIVIERUNG MIT DENDRITISCHEN ZELLEN	48
5.3.1	Expression von T-Zellmarkern auf CIK-Zellen	48
5.3.2	Bedeutung der T-Helferzellen bei der Cokultivierung von CIK-Zellen	48
5.3.3	Spezifität von T-Zellrezeptoren	49
5.3.4	Interferon-gamma Produktion cokultivierter CIK-Zellen	50
5.3.5	Zusammenfassung: Veränderungen cokultivierter CIK-Zellen	50
5.4	TRANSFEKTION DENDRITISCHER ZELLEN MIT DEM CIITA-GEN	50
5.4.1	Transfektion dendritischer Zellen	50
5.4.2	Eigenschaften CIITA transfizierter dendritischer Zellen	51
5.4.3	Zusammenfassung: Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen	51
5.5	AUSBLICK	51
ANHANG		53
	BIBLIOGRAPHIE	53
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	60
	TABELLENVERZEICHNIS	61
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
	LEBENS LAUF	65
	PUBLIKATIONS LISTE	66
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	67

Widmung

Diese Arbeit ist zuerst Ralf und all denen gewidmet, die ich schmerzlich in Berlin zurückgelassen habe.

Auch meinen ehemaligen onkologischen Patienten, deren Kraft, Schmerz und Leid mir unvergessen geblieben ist, ist diese Arbeit zugebracht.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Immun- und Gentherapeutischen Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmidt-Wolf an der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik I Bonn, Allgemeine Innere Medizin, Leitung Prof. Dr. T. Sauerbruch durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. Ingo Schmidt-Wolf für die interessante Themenstellung, für das freundschaftliche Klima und die unermüdliche Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Fragen. Meinen Kollegen gebührt großer Dank für das anregende Arbeitsklima, die interessanten Diskussionen, die immer gewährte Hilfsbereitschaft und das bereitwillige Erdulden meiner Eigenheiten. Ganz besonders danke ich Frau Silvia Weineck, die mir stets eine zuverlässige Hilfe war.

Ebenfalls danke ich den Chirurgen und Pathologen der Medizinischen Einrichtungen Bonn für die gute Zusammenarbeit bei der Bereitstellung gastrointestinaler Tumoren.

1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein hoch differenziertes Organ, das in der Lage ist, den Organismus sowohl unspezifisch, als auch spezifisch gegenüber fremden Antigenen zu schützen. Veränderte Zellen wie Tumorzellen können durch immunologische Effektorzellen, wie den zytotoxischen T-Zellen, abgetötet werden. T-Zellen verfügen über den T-Zellrezeptor, der spezifisch Antigene, die von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden, erkennt. Antigene werden von APC aufgenommen, prozessiert, in Form von Peptiden am *major histocompatibility complex* (MHC-Komplex) intrazellulär gebunden und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert. Professionelle APC exprimieren costimulatorische Faktoren, wie die Differenzierungscluster (CD) CD80 und CD86, diese werden von dem auf T-Zellen vorkommenden CD28 als Liganden gebunden (siehe Anhang, Tabelle 7: Auswahl an CD-Antigenen). Nur bei Vorliegen der costimulatorischen Signale kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen, fehlt ein Signal, können die Zellen anerg werden.

Tumoren entstehen durch das progressive Wachstum der Nachkommen einer einzigen transformierten Zelle, die der Kontrolle des Immunsystems entkommen ist. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß es Immunreaktionen auf Tumoren gibt (Van Der Bruggen et al., 1991; Boon et al., 1994), doch waren die Zusammenhänge über die Antigenpräsentation und die an der T-Zell-Aktivierung beteiligten Moleküle für die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes zu wenig erforscht. Erkenntnisse über tumorspezifische und tumor-assoziierte Antigene, die an der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden (Cheever et al., 1995; Rosenberg et al. 1996), und die Entwicklung von Methoden Tumorzellen und Komponenten des Immunsystems genetisch zu verändern, haben das Interesse an immuntherapeutischen Ansätzen verstärkt. In einer Vielzahl von Studien haben sich genmodifizierte Tumorzellen, zytotoxische T-Zellen und dendritische Zellen als immunmodulatorisch erwiesen. Um eine effektive spezifische anti-Tumorantwort zu erreichen, werden mindestens drei synergistische Signale benötigt (Bubenick, 1996):

- T-Zellrezeptoren auf zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ Zellen) bzw. T-Helferzellen (CD4⁺ Zellen), denen Tumorantigene im Zusammenhang mit MHC Klasse I bzw. MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden,

- nicht-antigenspezifische akzessorische/costimulatorische Signale, wie z.B. die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 auf T-Zellen,

- proliferative Signale, hervorgerufen durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren, um tumorreaktive Lymphozyten zu rekrutieren.

Der Verlust oder die Herunterregulierung von MHC-Molekülen, insuffiziente Antigenpräsentation oder unvollständige Signaltransduktion in T-Zellen kann zum Entkommen des Tumors aus der immunologischen Kontrolle führen (Natali et al., 1989; Maeurer et al., 1996). Andere Faktoren, z.B. von Tumoren sezernierter immunsuppressiv wirkender *transforming growth factor-β* (TGF-β), die Bildung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder die Freisetzung von Interleukin-10 (siehe Anhang, Tabelle 8: Auswahl an Zytokinen) durch den Tumor können die Kontrolle durch das Immunsystem verhindern (Barth et al., 1996; Gabrilovich et al., 1998). So haben die Zellen des malignen Melanoms zwar ein antigenes Profil, das dem natürlicher APC stark ähnelt, sind aber dennoch für T-Zellen nur schwach immunogen (Mackiewicz and Rose-John, 1998). Untersuchungen zur Häufigkeit von tumorantigenspezifischen T-Zellen in Melanompatienten konnten eine teilweise enorme Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen nachweisen, die aber dennoch nicht zytotoxisch waren. Diese T-Zellen waren selbst nach Stimulation mit Mitogenen nicht in der Lage, Zytokine zu produzieren und galten somit als anerg (Lee et al., 1999).

Der Vorstellung der Immuntherapie liegt zugrunde, daß Tumore über Antigene verfügen, die eine Immunität bewirken können (Van Pel and Boon, 1982). Die Entwicklung ging dabei von humoralen Ansätzen zu einem Schwerpunkt auf der zellulären Antwort über. Aufmerksamkeit erfuhr hierbei der Einsatz gentechnisch veränderter, meist autologer Tumorzellen als Vakzine (Gilboa and Lyerly, 1994; Dranoff and Mulligan, 1995). Hierbei werden Tumorzellen mit Zytokinen oder Genen für costimulatorische Signale transfiziert und in abgetöteter Form wiedergegeben (Schmidt-Wolf et al., 1994b). Mittlerweile wird davon ausgegangen, daß weder mit einem Antigen infizierte Zellen, noch Tumorzellen in der Lage sind, Antigene korrekt CD8⁺ T-Zellen darzubieten. Die Fähigkeit, naive CD8⁺ Zellen zu aktivieren, ist den APC vorbehalten. Darauf basierend entwickelte sich ein immuntherapeutischer Ansatz, in dessen Mittelpunkt dendritische Zellen stehen (Steinman, 1991).

1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen. Sie präsentieren Antigen naiven T-Zellen und sind in der Lage, spezifische zytotoxische Zellen nach einem vorhergehenden Kontakt mit T-Helferzellen (Ridge et al., 1998) oder auch unmittelbar zu stimulieren (Inaba et al., 1987). Dendritische Zellen sind ubiquitär in verschiedensten Geweben in niedriger Anzahl vorhanden, sie sind unregelmäßig geformt und verfügen über lange dendritische Ausläufer (Steimle et al., 1993). DC stammen von noch nicht genau definierten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab (lymphoide DC nehmen eine Sonderstellung ein und werden hier nicht behandelt). DC gelangen über das Blut in die Gewebe, wo sie als immature Zellen vorkommen, die sehr gut Antigene aufnehmen und prozessieren können, aber nur über geringe T-zellstimulierende Fähigkeiten verfügen. Nach einem Antigenkontakt oder dem Einwirken inflammatorischer Stimuli migrieren sie aus den Geweben in die afferente Lymphe (das sogenannte *homing*) und kommen in den Lymphknoten dann als interdigitierende retikuläre Zellen in den T-Zellbereichen vor (Steinman, 1991; Cella et al., 1997). Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Erscheinungsbild entscheidend geändert, die maturen DC sind jetzt nicht mehr in der Lage, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, verfügen nun aber über eine stark hochregulierte Fähigkeit zur T-Zellstimulation. Eine mature dendritische Zelle ist in der Lage, mehrere tausend T-Zellen zu stimulieren, hierbei bilden sich stabile Cluster zwischen den DC und den T-Zellen aus (Bancherau and Steinman, 1998).

Da die Anzahl der zirkulierenden DC viel zu gering für einen Einsatz in der Immuntherapie ist ($< 0,15\%$ der mononukleären Zellen, Steinman, 1991), liegen mittlerweile eine Reihe von Protokollen vor, nach denen dendritische Zellen gewonnen werden. Als Ausgangsmaterial dienen dabei Knochenmark, Nabelschnurblut, Leukapherese-Produkte oder periphere mononukleäre Blutzellen. Die isolierten Zellen können nachfolgend depletiert bzw. angereichert werden ($CD34^+$, $CD1a^+$, $CD14^+$) (Inaba et al., 1992; Saraya and Reid, 1996; Tarte et al., 1997; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Romani et al., 1996). Daran schließt sich eine Zytokinstimulation, die Interleukin-4 (IL-4) Granulozyten/Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α), Stammzellfaktor (SCF), IL-10 und andere Faktoren umfaßt (Romani et al., 1994; Saraya and Reid, 1996; Morel et al. 1997). Die erzeugten Zellen unterscheiden sich phänotypisch wie funktionell in Abhängigkeit von der Generierungsmethode (Hart, 1997). Romani entwickelte 1994 ein mittlerweile etabliertes Protokoll, das dendritische Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF generiert (Romani et al., 1994). Die so gewonnenen DC entsprechen der von Hart 1997 vorgeschlagenen Arbeitsdefinition für DC (Hart, 1997):

- a) Die Fähigkeit, primär eine T-Zellantwort zu stimulieren
- b) Das Vermögen durch Gewebe zu migrieren
- c) Relativ spezifische Phagozytoseaktivität
- d) Spontane Clusterbildung mit T-Zellen in vitro
- e) Oberflächenmarker, die sich deutlich von dem Phänotyp von Makrophagen, B-Zellen und anderer Immunzellen unterscheiden
- f) Expression DC-typischer Marker in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand
- g) Zytochemische Vorgänge, die sich deutlich von makrophagenspezifischen Reaktionen unterscheiden

Phänotypisch fehlen den dendritischen Zellen Monozytenmarker wie CD14, sie exprimieren costimulatorische Moleküle, Adhäsionsmoleküle und sehr hohe Spiegel an MHC-Molekülen. An spezifischen Markern sind bislang CD83, CMRF-44 und CMRF-56 beschrieben, deren Funktion unbekannt ist (bei CD83 wird ein Einfluß auf die T-Zellproliferation vermutet). Das Expressionsprofil ist stark abhängig von dem Reifegrad der Zellen (Hart, 1997). Dendritische Zellen sind in der Lage, Antigene durch Endo-, Pino- und Phagozytose aufzunehmen. Diese Fähigkeit ist stark abhängig vom Differenzierungszustand der Zellen. Für die Antigenaufnahme verfügen die DC über eine Reihe von Membranrezeptoren. Die Antigene werden durch intrazelluläre Proteasen und Peptidasen zu kleinen Peptidstücken abgebaut. Diese Peptide binden zytosolisch an Transporterproteine (*Transporters associated with Antigen Processing*, TAP) und werden in das MHC Klasse I-Kompartiment gebracht, wo sie in die Bindungsgrube der MHC-Moleküle binden, bevor diese *human leukocyte antigen*-Moleküle (HLA-Moleküle) an die Zelloberfläche gelangen.

DC sind befähigt auch extrazellulär vorliegende Peptide an MHC Klasse I-Moleküle zu binden. Für die Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen hingegen müssen die Antigene aufgenommen werden, damit sie nach einer Prozessierung präsentiert werden können (Egner et al., 1993; Fanger et al., 1996; Wood et al., 1991). Der turn-over der dendritischen MHC-Moleküle ist sehr langsam und die Expressionsdichte sehr hoch, so daß Peptide über einen langen Zeitraum präsentiert werden können (Steinman, 1991).

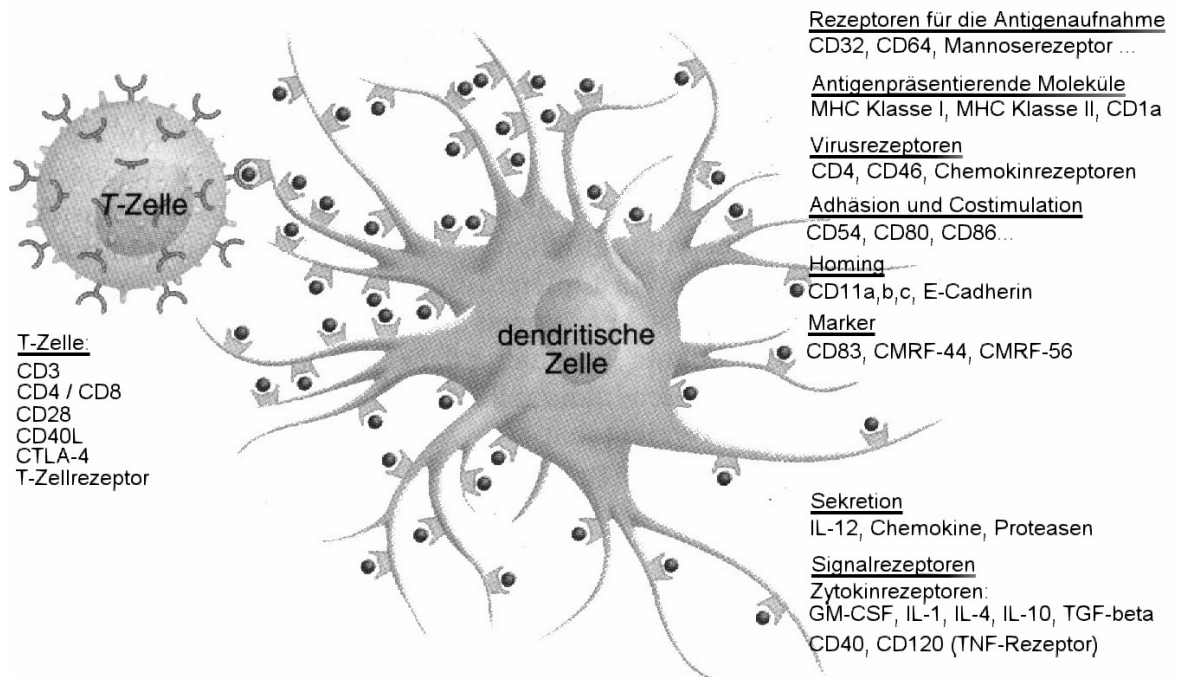


Abbildung 1: Merkmale dendritischer Zellen

Die geringe Immunogenität von Tumoren wird hervorgerufen durch die Unfähigkeit des Tumors, naive T-Zellen zu aktivieren, dies läßt den Einsatz von dendritischen Zellen in der Tumorthherapie sinnvoll erscheinen. DC, die Tumorantigene präsentieren, können äußerst potent zytotoxische Zellen aktivieren (Schuler and Steinman, 1997). Für den immuntherapeutischen Einsatz werden dendritische Zellen *ex vivo* mit Antigenen beladen (gepulst). Für das Pulsen können unterschiedliche Ansätze gewählt werden:

Eine Immunisierung mit definierten Tumorantigenen ist nur in seltenen Fällen möglich, da für viele Tumore keine Antigene beschrieben sind (Boon et al., 1994), und die Gefahr besteht, daß Tumorantigene sich durch Mutation dem immunologischen Angriff entziehen. Das Pulsen mit tumorspezifischen Peptiden, deren Antigenität bekannt ist, bewirkt die extrazelluläre Bindung an MHC Klasse I-Molekülen. Dieser Ansatz erfordert die genaue Beschreibung von Tumorantigenen und HLA-spezifischen Bindungsstellen (Murphy et al., 1996).

Ähnliches gilt für das Pulsen mit tumorspezifischen Proteinen, die von den DC aufgenommen und prozessiert werden. Bei diesem Ansatz können allerdings auch noch unbekannte antigene Determinanten des Proteins nicht-HLA restriktiv präsentiert werden (Inaba et al., 1990). Die Verwendung von Tumorslysaten zum Pulsen kann eine weitaus größere Anzahl auch unbekannter Antigene abdecken, erfordert aber die operative Gewinnung größerer Mengen von Tumormaterial bzw. dessen Vermehrung *in vitro* (Nair et al., 1997). Nachteilig hierbei ist die bislang noch nicht beschriebene, aber theoretisch mögliche Induktion einer Autoimmunität (Parmiani, 1993).

Bei der Verwendung von Tumor *messenger*-RNA (oder cDNA) zum Pulsen reicht die Entnahme weniger Tumorzellen, deren mRNA amplifiziert werden kann. Die RNA (DNA) wird aufgenommen, translatiert, das resultierende Protein wird prozessiert und an MHC Klasse I-Molekülen präsentiert. Eine tumorspezifische RNA kann durch subtraktive Hybridisierung mit RNA aus gesundem

Gewebe angereichert werden, damit kann die Konzentration nicht-tumorspezifischer Antigene gesenkt werden (Boczkowski et al., 1996).

Im Vergleich zu Immuntherapien mit gentechnisch veränderten Tumorzellen sind Vakzinationen mit dendritischen Zellen leichter durchführbar und kostengünstiger (Gilboa and Lyster, 1994). Autologe dendritische Zellen können *ex vivo* generiert, mit Antigenen gepulst und im muren Zustand zurückgegeben werden (Gilboa and Lyster, 1994). Im Tiermodell ergaben sich sehr vielversprechende Ergebnisse (Nair et al., 1997; Boczkowski et al., 1996; Murphy et al., 1996), mehrere klinische Studien haben bereits begonnen (Höftl et al., 1998; Brossart et al., 1999; Nestle et al., 1998).

1.2 Immunologische Effektorzellen

In der adoptiven Immuntherapie kommen zytotoxische Zellen zum Einsatz. Ein Hauptproblem hierbei stellt die Bereitstellung ausreichend großer Mengen reaktiver Zellen dar. Zytotoxische T-Lymphozyten mit dem Phänotyp CD3CD8 erkennen Antigene, die ihnen in Zusammenhang mit MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Sie setzen bei der Bindung an eine Zielzelle Perforin, Granzym und oftmals auch Interferon-gamma frei. Die ebenfalls physiologisch vorkommenden natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind große lymphatische Zellen, die über zytotoxische Aktivität verfügen. Neben der Lyse virusinfizierter Zellen sind sie in der Lage, ohne vorhergehende Sensibilisierung Tumorzellen zu zerstören.

Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) wurden 1980 erstmals beschrieben (Lotze et al., 1980). Hierbei handelt es sich um durch Interleukin-2 Gabe aktivierte NK-Zellen, die in der Lage sind, entartete Zellen zu erkennen, durch die Freisetzung von Granzymen und perforinhaltiger Granula zu lysieren und Apoptose zu induzieren. Die Mehrheit der LAK-Zellen stammen von NK-Zellen ab und stellen eine heterogene Population von Effektorzellen dar, die Tumore ohne MHC-Restriktion erkennen. Sie exprimieren mit dem Oberflächenphänotyp CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NK-Zellmarker und sind negativ für T-Zellmarker. Problematisch ist die geringe antitumorale Wirkung *in vivo* (Mule et al., 1984) und die Schwierigkeit bei der Gewinnung großer Zellzahlen.

Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TILs) verfügen über eine stärkere zytotoxische Wirkung als LAK-Zellen und können durch Interleukin-2 Gabe aus Lymphozyten in Tumorgewebe generiert werden. Nach 2-3-wöchiger Kultur einer Tumoreinzellsuspension kann unter dem Einfluß von IL-2 eine tumorfreie Lymphozyten-Kultur erhalten werden (Rosenberg, 1992). TILs vermitteln ihre Zytotoxizität MHC-restriktiv (Rosenberg et al., 1986). Da der Einsatz von tumordinfiltrierenden Lymphozyten limitiert ist durch die Schwierigkeiten bei der Gewinnung ausreichend großer Zellzahlen, wurden neuartige Protokolle für die Bereitstellung zytotoxischer Zellen entwickelt.

Durch die kombinierte Gabe von Interleukin-1 β , Interleukin-2, Interferon-gamma (IFN- γ) und monoklonalem Antikörper gegen CD3 (mAK CD3) können periphere Blutlymphozyten aktiviert werden. Diese *zytokin-induzierten Killerzellen* (CIK-Zellen) setzen sich zu 80-90% aus CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellen und zu 10-15% aus CD3⁺CD56⁺ Zellen zusammen. Zellen mit dem Phänotyp CD3⁺CD56⁺ haben eine wesentlich höhere Proliferationsrate als LAK-Zellen und vermitteln eine stärkere Zytotoxizität als diese (Lanier et al., 1986, Schmidt et al., 1986). Der Anteil von CD3⁺CD56⁺ Zellen ist in peripheren Blutlymphozyten mit 1-5% gering (Schmidt-Wolf et al., 1991; Schmidt-Wolf et al., 1993), er nimmt in CIK-Zellkulturen im Laufe der Kultivierung zu und erreicht nach 1-2 Monaten ein Plateau (Schmidt-Wolf et al., 1994). Die meisten der CD3⁺CD56⁺ Zellen coexprimieren CD2, die α - und die β -Kette des T-Zellrezeptors (TCR- α/β), CD8 und sind negativ für CD4 und CD16. CD3⁺CD56⁺ Zellen, die unter diesen Kulturbedingungen gewonnen werden, stammen von T-Zellen und nicht von NK-Zellen ab (Lu and Negrin, 1994). CIK-Zellen sezernieren IL-2, IL-6 und TNF- α . Ähnlich wie NK-Zellen exprimieren CIK-Zellen *killer inhibitory receptors* (KIRs) (Margolin et al., 1997), bei fehlender Aktivierung von *killer inhibitory receptors* durch die Targetzellen kann es zur Lyse kommen. Die zellvermittelte Zytolyse der CIK-Zellen wird durch Exozytose zytoplasmatischer Granula, die die Zellmembran der gebundenen Tumorzelle penetrieren, hervorgerufen. Die Granula sezernieren das Enzym BLT-Esterase (BLT = N- α -Benzyl-oxycarbonyl-L-Lysin Thiobenzolester). Die Stimulation der CIK-Zellen mit Tumorzellen oder mit

mAK CD3 ist für die Exozytose erforderlich, ebenso die zelluläre Interaktion des *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) mit seinem Liganden *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Die zytotoxische Wirkung von CIK-Zellen kann durch Zugabe von mAK gegen LFA-1 oder ICAM-1 blockiert werden (Lotze et al., 1980). CIK-Zellen vermitteln keine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), da keine Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert werden. Die Antitumor-Effekte von LAK-Zellen und CIK-Zellen sind im Tiermodell mit schwer immundefizienten Mäusen (SCID-Maus Modell) untersucht worden. In diesem Modell zeigten sich die CIK-Zellen gegenüber den LAK-Zellen überlegen (Lu and Negrin, 1994).

Anstelle von Interleukin-2 können auch IL-7 oder IL-12 zur Generierung von CIK-Zellen verwendet werden, allerdings proliferieren durch IL-7 bzw. IL-12-Stimulation gewonnene CIK-Zellen weniger im Vergleich zu IL-2 induzierten. Die zytotoxische Wirkung von Interleukin-7 stimulierten Zellen ist gleich der von IL-2 induzierten (Csipai et al., 1996). Die Stimulation mit IL-12 vermittelt eine höhere Zytotoxizität (Zoll et al., 1998). Mit dem Interleukin-7 Gen transfizierte CIK-Zellen wurden bei der ersten deutschen Gentherapiestudie eingesetzt (Schmidt-Wolf et al., 1994; Schmidt-Wolf et al., 1994b).

1.3 Tumore des gastroenteropankreatischen Systems

Karzinome des Kolons und des Rektums gehören zu den häufigsten Tumoren überhaupt, da ihre Heilungsrate ca. 50% beträgt, sind neue Therapieansätze gefragt. Ätiologisch weisen beim kolorektalen Karzinom (CRC) neben familiärer Disposition, Umweltfaktoren wie den Ernährungsgewohnheiten auf eine wesentliche Rolle für die Entstehung hin. Das Risiko an einem CRC zu erkranken, steigt bei einer Kost, die reich an tierischen Fetten und rotem Fleisch, faser-, gemüse- und kalziumarm ist, sowie bei geringer körperlicher Bewegung und großem Bierkonsum. Ca 10% der kolorektalen Karzinome gehen auf eine besondere genetische Disposition zurück, auf deren Boden karzinogene Einflüsse besonders wirksam sein können (Toribara and Sleisinger, 1995). Das kolorektale Karzinom breitet sich lokal in das perirektale oder perikolische Fettgewebe aus, daneben über die Lymphbahnen und bei Einbruch in die Gefäße auf hämatogenem Wege. Die Metastasen haben eine Prädisposition für Leber und Lunge, seltener Skelett und Gehirn. Die Prognose des CRC ist wesentlich abhängig von der primären Tumorausdehnung sowie von der biologischen Aggressivität der Tumorzellen. Prognostisch relevant ist, ob Mikrometastasen in ihrer jeweiligen Umgebung wachsen können. Therapeutisch werden die chirurgische Tumoresektion sowie beim Kolonkarzinom die adjuvante Chemotherapie, bzw. beim Rektumkarzinom die Radio-/Chemotherapie eingesetzt (Schmoll et al., 1997).

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Erkrankung mit der Eigenschaft, frühzeitig subklinische Metastasen auszubilden. Die Häufigkeit des Pankreaskarzinomes variiert in den westlichen Industrieländern, die Inzidenz liegt bei der männlichen Bevölkerung bei 10-12/100.000, bei der weiblichen Bevölkerung bei 7,5-9/100.000. Die Ätiologie ist unbekannt, sozioökonomische Faktoren sowie geographische Faktoren haben keinen signifikanten Einfluß auf die Inzidenz. Zigarettenrauchen konnte als Risikofaktor bestätigt werden, sowie einige Chemikalien (α -Naphthylamin, DDT und Ethylen). Bei ca. 80% der Pankreasmalignome handelt es sich um duktales Adenokarzinome. Das Pankreaskarzinom hat unter den gastrointestinalen Karzinomen die schlechteste Prognose. Therapeutisch werden Resektion mit eventuell postoperativer adjuvanter Chemotherapie durchgeführt, bzw. beim Vorliegen von Fernmetastasen wird eine palliative, d.h. eine nicht auf Heilung zielende, sondern an Beschwerdenlinderung und Lebensqualitätsverbesserung orientierte, Chemotherapie durchgeführt. Die Fünfjahresüberlebensrate für alle Stadien beträgt <1% mit einer medianen Überlebenszeit von 4-6 Monaten (Schmoll et al., 1997).

Adjuvante postoperative Chemotherapie bedeutet, daß eine Therapie mit Zytostatika eingeleitet wird, obwohl Metastasen nicht nachweisbar sind, denn auch nach kurativ intentionierter Operation erleidet ein Teil der Patienten mit einem Kolonkarzinom einen Rückfall der Erkrankung (Lokalrezidiv oder Fernmetastasen). Bei allen Patienten mit einem Tumorerzidiv besteht demnach eine residuale Tumorerkrankung, die für das Rezidiv verantwortlich ist. Als Strategie böten sich immunologische Therapieformen an. Patienten mit minimaler Tumorerkrankung nach einer

Operation eines Kolonkarzinoms sollten von immunologischen Therapieformen besonders profitieren, da diese Therapieformen ihre höchste Effektivität bei geringer Tumorlast haben (Van Pel and Boon, 1982).

Zum Einsatz in der Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms und des Pankreaskarzinoms kommen Antimetabolite, die durch Bindung an Enzymen die DNA-Synthese hemmen und somit die Zellteilung unterbinden. Dosis einschränkend bei der Chemotherapie sind die teilweise sehr schweren Nebenwirkungen, die dadurch hervorgerufen werden, daß die Substanzen alle sich teilende Zellen angreifen. Besonders stark betroffen sind dabei die sich häufig teilenden Zellen des Immunsystems, des blutbildenden Systems und der Schleimhäute.

1.4 Tumor-assoziierte Antigene

Transformierte Zellen exprimieren qualitativ und quantitativ andere Antigene als Gewebe unter physiologischen Bedingungen. Der Nachweis solcher tumor-assoziierten Antigene in Patientenserum kann eine Möglichkeit zur Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Prognostik darstellen (Seleznick, 1992). Die meisten Tumormarker sind Glykoproteine, die eine Funktion bei der Zelladhäsion, der Zell-Zell-Erkennung, bei der Zellaktivierung und bei der Signaltransduktion haben. Im folgenden wird auf die tumor-assoziierten Antigene CEA und CA 19-9 ausführlicher eingegangen.

Carcinoembryonic antigen (CEA) ist ein onkofetales Protein, das während der Embryonal- und Fetalzeit gebildet wird und ist der bekannteste und am besten beschriebene Tumormarker (Gold and Freeman, 1965). CEA kommt hauptsächlich im fetalen Gastrointestinaltrakt und im fetalen Serum vor. Die Bildung von CEA wird nach der Geburt reprimiert. CEA ist nicht organspezifisch, und erhöhte Serumwerte finden sich bei vielen Tumorentitäten, speziell bei gastrointestinalen Tumoren. 95% aller kolorektalen Karzinome exprimieren CEA, und die Serumwerte korrelieren mit der Tumorausdehnung. Beim Pankreaskarzinom sind ungewöhnlich hohe CEA-Werte nachweisbar. Einschränkung für die Diagnostik wirkt sich die überaus geringe Sensitivität bei Patienten mit minimal residualer Erkrankung und der Einfluß des Rauchens und gutartiger gastrointestinaler Erkrankungen auf die Spezifität aus.

CEA kommt in zwei Formen vor, mit einem Molekulargewicht von 160.000 Dalton bzw. 180.000 Dalton. Die CEA Genfamilie gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und umfaßt eine große Anzahl von Genen, sie gliedert sich in zwei Untergruppen, die CEA- und die schwangerschaftsspezifische Glykoprotein-Untergruppe. Die Mehrzahl der CEA-Untergruppenproteine sind stark glykosiliert und kommen entweder transmembran oder über einen Glykosylphosphatidylinositolanker mit der Plasmamembran verbunden vor (Öbrink, 1997). Das Vorhandensein eines CEA exprimierenden Tumors muß nicht unbedingt im Serum nachweisbar sein, da eine Sekretion ins Serum nicht zwangsläufig ist. Die Sekretion von CEA kann *in vitro* durch die bakterielle glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C bewirkt werden, die Vorgänge *in vivo* sind noch ungeklärt (Yeatman et al., 1995; Low and Prasad, 1988). Schlom konnte 1995 die Peptidsequenzen der Epitope des CEA identifizieren, die von den MHC Klasse I-Molekülen der zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Eine Peptidsequenz die restriktiv von HLA-A2⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird, wurde CAP-1 benannt (Schlom, 1995).

Cancer associated antigen (CA 19-9) ist ein Glykolipid mit einem Molekulargewicht um 10.000 Dalton, das einem Hapten der Lewis-a-Blutgruppenderminante entspricht. 3-7% der Bevölkerung haben die Blutgruppenkonstellation Lewis a-negativ/b-negativ, und können somit kein CA 19-9 exprimieren. CA 19-9 kommt im fetalen Epithel von Magen, Darm und Pankreas vor. Mit einer Sensitivität von 70-87% helfen CA 19-9 Testwerte bei der Differentialdiagnose und Verlaufskontrolle von Pankreaskarzinom-Patienten (Haglund et al., 1986). Es besteht keine Korrelation der CA 19-9 Serumwerte mit der Tumormasse. CA 19-9 ist auch bei anderen gastrointestinalen Tumoren nachweisbar, erhöhte Werte finden sich auch bei einer Reihe benignen, inklusive entzündlicher Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, sowie bei der Mukoviszidose.

1.5 Gentransfer in dendritische Zellen

Zum Einbringen fremder genetischer Information in eukaryotische Zellen stehen mittlerweile diverse Techniken zur Verfügung. Die Entscheidung für eine bestimmte Gentransfermethode ist abhängig von den Zielzellen, von den Sicherheitsrisiken und wird bestimmt von der Frage nach einer transienten oder langfristigen Genübertragung. Grob kann zwischen physikalischen und viralen Methoden unterschieden werden. Die Effizienz des Gentransfers kann mittels Markergenen, wie dem *LacZ*-Gen oder dem *green fluorescent protein* (GFP)-Gen bestimmt werden. Zu den physikalischen Methoden zählen die Elektroporation, der magneto-ballistische Gentransfer, die Liposomentechnik, sowie der ligandenvermittelte Transfer. Da die physikalischen Systeme nur eine recht geringe Effizienz haben, wurden virale Vektoren wie Adeno-, Retro, Herpes- und adenoassoziierte Viren etabliert.

Dendritische Zellen aus Monozyten lassen sich nur schlecht auf physikalischem Wege transfizieren (Jill et al., 1997). DC und Langerhans-Zellen, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen generiert werden, können mittels Elektroporation mit einer Effizienz von bis zu 16% transfiziert werden (Tendeloo et al., 1998). Beim retroviralen Gentransfer konnten bei 'jungen' DC aus peripheren mononukleären Blutzellen (1-2 Tage alt) Effizienzen zwischen 28 und 67% erreicht werden, ohne die Zellen zu schädigen (Westermann et al., 1998; Aicher et al., 1997). Die Transduktionsrate bei DC, die aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewonnen werden, liegt zwischen 15 – 21% (Szabolcs et al., 1997).

Als kompetentester Vektor für die Infektion von dendritischen Zellen haben sich Adenoviren erwiesen. Unabhängig vom Ursprung der dendritischen Zellen werden Effizienzen zwischen 80 und 100% beschrieben (Dietz and Vuk-Pavlovic, 1998; Di Nicola et al., 1997; Diao et al., 1999; Gong et al., 1997). Wegen bestehender Sicherheitsbedenken und um eine potentielle Immunogenität der Adenoviren zu umgehen, können Adenoviren durch UV-Bestrahlung inaktiviert werden (Cristiano et al., 1993). An das Virus können dann kovalent Poly-L-Lysin oder Polyethylenimim gekoppelt werden, Plasmid-DNA bindet über diese Konjugate an das Adenovirus, das die Plasmid-DNA über die adenoviralen Infektionswege in die Zelle schleust, ohne sein eigenes zerstörtes Genom einbringen zu können (Diebold et al., 1999; Mulders et al., 1998).

Für den adenoviralen Gentransfer werden meist Adenoviren des Serotyp 5 verwendet. Adenoviren haben einen Durchmesser von 60-90 nm, Fibern und einen ikosaedrischen Aufbau. Das Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA von ungefähr 36 Kilobasen Länge, jedes Ende des viralen Genoms verfügt über das *inverted terminal repeat* (ITR), das linke Ende enthält das Verpackungssignal, beide Elemente werden für die virale Replikation und Verpackung benötigt. Man unterscheidet Bereiche der frühen und der späten Genexpression. Die E1-Region (*early 1*) enthält Gene, die für Proteine, die für Regulation und Transkription des viralen Genoms verantwortlich sind. Adenovirale Vektoren sind E1-deletiert, so daß die Viren ohne eine Wirtszelllinie (üblicherweise die Zelllinie 293), die die E1-Region in trans zur Verfügung stellt, replikationsdefizient sind. Die Infektion einer humanen Zelle durch ein Adenovirus basiert auf dem Zusammenspiel von zwei zellulären Rezeptoren mit dem Virus. Zuerst bindet das Virus mit seinem Fiberprotein an einem 46Kilodalton großen transmembranen Rezeptor, der als Coxsackievirusrezeptor (CAR) bekannt ist. Der Viruseintritt in die Zellen geschieht durch Internalisierung in clathrinbedeckte Vesikeln und wird über die Bindung viraler Pentonbasisproteine an die zellulären Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt (Bergelson et al., 1997; Wickham et al., 1993).

Die Verwendung adenoviraler Vektoren bietet mehrere Vorteile: Adenoviren sind gut beschrieben und untersucht; sie integrieren nicht in das Wirtsgenom, sondern liegen episomal vor; sie können im Gegensatz zu Retroviren auch Zellen infizieren, die sich nicht teilen; sie verfügen über eine hohe Kapazität für Fremdgene (bis zu 32 Kilobasen) und sie können in hohen Virustitern gewonnen werden (Zhang, 1999).

1.6 CIITA

Die präzise Regulation der MHC Klasse II-Gene spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle einer Immunantwort. MHC Klasse II-Moleküle, die den CD4⁺ T-Zellen Peptide präsentieren, binden Peptide von Proteinen, die in angesäuerten Vesikeln abgebaut wurden. Die Präsentation von antigenen Peptiden durch den MHC Klasse II-Komplex erfordert die Coexpression der invarianten Kette, welche zum einen in der antigenbindenden Furche bindet, um Peptidbindung im endoplasmatischen Retikulum zu verhindern, zum anderen die MHC Klasse II-Komplexe in spezielle zelluläre Kompartimente führt, wo die Fremdpeptidbeladung stattfindet. Des Weiteren wird das enzymatische HLA-DM Protein benötigt, welches die Proteine der invarianten Kette beseitigt und die Fremdanigenbindung somit ermöglicht (Denzin and Creswell, 1995; Fremont et al., 1996; Sherman et al., 1995).

Genetische und biochemische Analysen haben verschiedene DNA-bindende und nicht DNA-bindende Proteine identifiziert, die die Funktion von MHC Klasse II-Genen regulieren (Boss, 1997). Die Gene für die invariante Kette, HLA-DM und für die MHC Klasse II-Komplexe stehen unter der Kontrolle des MHC II-Transaktivators CIITA (Chang et al., 1996). CIITA ist ein 125 kDa großer, nicht DNA-bindender Transkriptionsaktivator, dessen Domänen mit Transkriptionsfaktoren assoziiert sind (Chin et al., 1997). Das Gen für CIITA konnte 1993 kloniert werden (Steimle et al., 1993). CIITA ist auch an der IFN- γ induzierten Expression von MHC Klasse II-Komplexen beteiligt und kann ebenfalls die Expression von MHC Klasse I-Komplexen bewirken, indem es den Promotor des MHC Klasse I-schwere Ketten-Genes induziert (Martin et al., 1997). Die zentrale Bedeutung des Transaktivators zeigt sich im Tierversuch. Mäuse ohne CIITA zeigen eine Behinderung der MHC Klasse II-Expression (Chang et al., 1996). Beim Menschen führt das Fehlen von CIITA zu einer schweren Immundefizienz, dem *bare lymphocyte syndrome* (Nackte-Lymphozyten-Syndrom).

2 Zielsetzung

Das Immunsystem ist in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu vernichten. Tumore können sich dieser immunologischen Kontrolle jedoch entziehen, z.B. durch die Sekretion von Interleukin-10 oder *vascular endothelial growth factor*, durch die die Funktion und die Reifung von dendritischen Zellen *in vivo* gehemmt wird. Vor dem Hintergrund der hohen Rezidivrate von Patienten mit gastroenteropankreatischen Tumoren sind immunologische Ansätze entwickelt worden. Um zytotoxische tumorspezifische T-Zellen zu rekrutieren, ist die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen in Verbindung mit MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen notwendig.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu etablieren, bei dem immunologischen Effektorzellen (CIK-Zellen) durch eine Kokultivierung mit dendritischen Zellen eine erhöhte Zytotoxizität gegen gastroenteropankreatische Tumore vermittelt wird. Hierfür sollten aus dem peripheren Blut sowohl gesunder Spender als auch von Tumorkranken dendritische Zellen generiert werden, deren Eigenschaften es durchflußzytometrisch zu charakterisieren galt.

Um eine spezifische anti-Tumorantwort zu induzieren, sollten dendritische Zellen mit Tumorantigenen gepulst werden. Der geeignete Zeitpunkt und die optimale Dosis mußten bestimmt werden. Die Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen sollte in LDH-Freisetzungstests zuerst gegen Zelllinien, später gegen autologe Primärkulturen bestimmt werden. Es galt die Spezifität der mit gepulsten dendritischen Zellen kokultivierten Effektorzellen mittels Antigenblockadetests abzuklären.

T-Helferzellen, die an MHC Klasse II-Moleküle auf dendritischen Zellen binden, konditionieren die dendritische Zelle, die dann in der Lage ist, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. CIITA bewirkt eine Hochregulation von MHC Klasse II-Molekülen. Um eine weitere Verstärkung der induzierten Zytotoxizität zu erreichen, sollten dendritische Zellen mit dem Gen, das für den Transaktivator CIITA codiert, transfiziert werden. Hierfür mußte eine Gentransfermethode gefunden werden, die hinreichend hohe Transfektionseffizienzen bei dendritischen Zellen bewirkt. Die Effizienz sollte ermittelt werden, das transduzierte Gen nachgewiesen und die durch die Transfektion mit dem CIITA-Gen bewirkten Veränderungen bei den dendritischen Zellen durchflußzytometrisch und funktionell bestimmt werden.

Abschließend sollten phänotypische und funktionelle Veränderungen kokultivierter CIK-Zellen untersucht werden. Hierfür sollten methodisch die Durchflußzytometrie, die ELISpot-Technik und der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen mittels der Dimertechnik eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Es wurden Einwegmaterialien der Firma Falcon® (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet.

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Biochrom KG (Berlin)	Collagenase III; Collagenase IV; Gentamycin; Penicillin/Streptomycin; MEM Vitamine 100x; Trypanblau 0,5%; L-Glutamin; L-15 Medium
BioRad (München)	BCIP/NBT Substrat
B.Braun (Melsungen)	Glukose 20%
Gibco BRL (Karlsruhe)	2-Mercaptoethanol, HBSS Puffer, HEPES, humanes rekombinantes Transferrin, Lymphoprep, RPMI 1640 mit Glutamax; RPMI 1640 farblos; Taq-Polymerase; Natriumhydrogencarbonat
Hoechst (Bad Soden a. Ts)	Humanes Alt-Insulin
Hözel Diagnostics (Köln)	Humanes IFN- γ ELISpot Kit
Invitrogen (Groningen, Niederlande)	β -gal-staining kit
PAA (Cölbe)	BSA; FCS (Lot A01428-291); PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Qiagen (Hilden)	Plasmidpräparation-Mega-Endotoxin free-Kit; QiaShredder-Kit; RNA-Präparations Kit
Roche Diagnostics (Mannheim)	DNA-Marker III; DNase I; Cytotoxicity Detection Kit
Sigma (Deisenhofen)	Ammoniumchlorid; Ampicillin; Agarose; Bacto Agar; Borsäure; Bromphenolblau/Xylencyanol; D-Glukose; DMSO 99%, EDTA; Ethidumbromid; Glyzerol; Hefeextrakt; Hyaluronidase; IGEPA; Isopropanol; Kaliumhydrogencarbonat; di-Kaliumhydrogenphosphat; Kaliumdihydrogenphosphat; Kalziumchlorid; Kanamycin; Magnesiumchlorid; Natriumazid; Myoglobin (aus Rinderherz); Natriumchlorid; Natriumzitat; Pepton; Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht von 160-200.000Da; Salzsäure; Schwefelsäure; Tris Base; Zitronensäure

3.1.2 Zytokine und Stimulanzen

Boehringer Ingelheim (Ingelheim)	Imukin (humanes rekombinantes Interferon-gamma)
Calbiochem (Schwalbach)	Cancer Associated Antigen; Carcinoembryonic Antigen

Chiron (Ratingen)	Proleukin (humanes rekombinantes Interleukin-2)
Essex Pharma (München)	Leucomax 300 (GM-CSF); humanes rekombinantes Interleukin-4
Eurogentec (Hamburg)	CAP-1 mit der Aminosäuresequenz: YLSGANLNL; PepCD19 mit der Aminosäuresequenz: IFAAAQEL
Roche Diagnostics (Mannheim)	humanes rekombinantes Interleukin-1 β
Sigma (Deisenhofen)	Phytohämagglutinin

3.1.3 Antikörper

Beckman-Coulter (Krefeld)	Isotypkontrolle anti-Maus IgG1-PE/FITC; Isotypkontrolle anti-Maus IgM -FITC, anti CD3 (HIT3a)-FITC (IgG2a); anti CD3 (UCHT1)-FITC; anti CD4 (13B8.2)-PE; anti CD8 (B9.11)-PE; anti CD14 (RMO52)-PE; anti CD80 (MAB104)-FITC; anti CD83 (HB15A)-FITC; anti CD86 (HA5.2B7)-FITC; anti CA 19-9 (121-SLE)-IOPath
Chemicon (Tenecula, CA, USA)	anti $\alpha_v\beta_5$ (MAB 1961)
DAKO Diagnostics (Hamburg)	anti CD66a/b/c/d/e (Kat4c)-FITC (anti CEA)
Janssen-Cilag (Neuss)	Orthoclone OKT3 (Muromonab = anti CD3)
Medac (Wedel)	Ziege anti Maus IgG1-PE
Pharmingen (Hamburg)	anti CD1a (HI149)-PE; anti HLA-ABC (MaP.DM1)-FITC; anti HLA-DR (TÜ36)-FITC
Sigma (Deisenhofen)	anti CD8 (UCHT-4)-FITC (IgG2)
	HLA-A2/IgG1-Komplex (Dimer) war eine freundliche Gabe von T. Greten, Medizinische Hochschule Hannover
	anti CA-Rezeptor war eine freundliche Gabe von T. Heinicke, Medizinische Einrichtungen Bonn
	anti CMRF-44 (IgM) war eine freundliche Gabe von D.N.J. Hart, Christchurch Hospital, Neuseeland

Soweit nicht anders vermerkt handelt es sich um monoklonale IgG1-Antikörper von der Maus, die gegen menschliche Epitope gerichtet sind.

3.1.4 Zelllinien

DSMZ (Braunschweig)	DAN-G (humane Pankreaskarzinomzelllinie) 293 (embryonale Nierenzellen)
ECACC (Salisbury, Wiltshire, UK)	Colo 201; Colo 205 (humane Kolonkarzinom-Zelllinien)

3.1.5 Bakterien, Plasmide, Primer

Invitrogen (de Schelp, Niederlande)	pcDNA3.1/HisB/LacZ
Mologen (Berlin)	pcR2.1-TOPO-HSCIITA (das Insert mit einer Größe von 3,5kb beinhaltet das CIITA-Gen, das unter CMV-Promotor Kontrolle steht)
Stratagene (Amsterdam, Niederlande)	XL1-Blue MRF' strain (Epicurian Coli); β-Aktin-Primer (ergeben ein Fragment von 661 Basenpaaren Länge)
TIB Molbiol (Berlin)	CIITA-Primer (forward: GAG GCT TAT GCC AAT ATC GCG) (reward: CTA GGA TGA GCA GAA CGC GGT); Die Primer binden an den Stellen +277 (forward) und +1356 (reward)
	UV-inaktivierter Adenovirus, Typ 5, kovalent an Poly-L-Lysin gekoppelt (AdV-PLL) mit einem Titer von $8-10 \times 10^{10}$ <i>plaque forming units/ml</i> (pfu/ml) wurde von Nancy Weigel, BCM Texas Medical Center, Houston, TX, USA bezogen

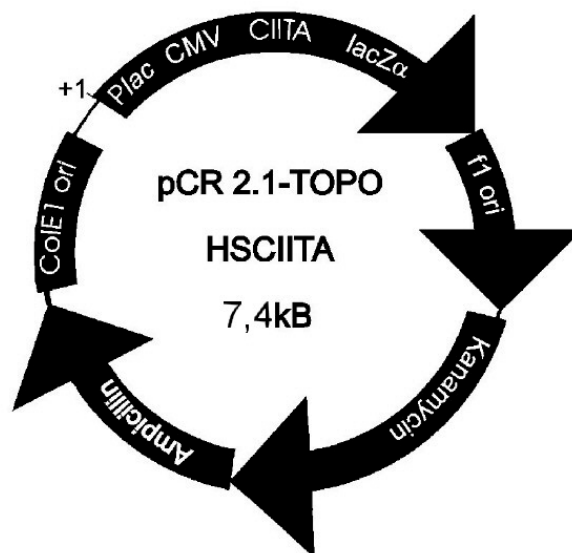


Abbildung 2: Vektorkarte des pCR2.1-TOPO-HSCIITA

3.1.6 Lösungen und Puffer

ACD	Natriumzitrat 16 g/L; Zitronensäure 4,7 g/L; D-Glukose 25 g/L in Aqua bidest, bei 121 °C autoklaviert
Blocking solution	BSA 4% in PBS, durch 0,2 µm-Filter sterilfiltriert
Erythrozytenlyse-Puffer	Ammoniumchlorid 8,29 g/L ; Kaliumhydrogencarbonat 1,0 g/L; EDTA 0,0371 g/L in Aqua bidest, durch 0,2 µm-Filter sterilfiltriert
HBS-Puffer	Natriumchlorid 150 mM; HEPES 20 mM pH 7,3; in Aqua bidest; bei 121 °C autoklaviert
Isolutionslösung	DNase I 10 ⁸ U/L; Collagenase III 240 mg/L; Collagenase IV 560 mg/L; Hyaluronidase 200 mg/L; H-Alt-Insulin 80 U/L in HBSS-Puffer, durch 0,2 µm-Filter sterilfiltriert
Ladepuffer 6×	EDTA 0,2 M; Glycerol 25%; Bromphenolblau/Xylencyanol 0,4% in 1× TBE-Puffer
PBS ⁺⁺	Magnesiumchlorid 0,1 g/L; autologes Serum 2% in PBS
TBE 10×	Tris Base 108 g/L; Borsäure 55 g/L; EDTA 20 mM pH 8,0 in Aqua bidest

3.1.7 Kulturmedien

RPMI-Medium	Fetales Kälberserum 10% (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert); Penicillin 10 ⁵ U/L; 10 ⁵ µg/L Streptomycin in RPMI 1640 mit Glutamax
Hepes-Medium	Fetales Kälberserum 10% (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert); Penicillin 10 ⁵ U/L; 10 ⁵ µg/L Streptomycin; HEPES 25 mM in RPMI 1640 mit Glutamax
DC-Medium	Autologes Serum 10%; Penicillin 10 ⁵ U/L; 10 ⁵ µg/L Streptomycin; HEPES 25 mM in RPMI 1640 mit Glutamax
Zytotox-Medium	Fetales Kälberserum 2% (30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert); Penicillin 10 ⁵ U/L; 10 ⁵ µg/L Streptomycin; L-Glutamin 1 mM; HEPES 25 mM in RPMI 1640 farblos
Leibovitz-Medium	L-Glutamin 1 mM; Glukose 20% 2,5ml/L; MEM-Vitamine 1×; hTransferrin 2,5 g/L; Natriumhydrogencarbonat 1 g/L; Gentamycin 10 mg/L; H-Alt-Insulin 80 U/L; Amphotericin B 2,5 mg/L in L-15 Medium

Einfriermix	DMSO 20%; FCS 40% Zellkulturmedium 20%
LB-Medium (LB-Agar)	Pepton 10 g/L; Natriumchlorid 10 g/L; Hefeextrakt 5 g/L; Ampicillin 200 mg/L; Kanamycin 10 mg/L, (Agar 15 g/L) in Aqua bidest; bei 121 °C autoklavieren; Zugabe von Antibiotika bei 40 °C

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Cytoperm 2, Heraeus, Hanau). Zur Zellernte und für Medienwechsel wurden adhärenzte Zellen mechanisch mittels eines cell-scrapers bzw. eines Gummiwischers gelöst. Die so gewonnenen Zellen wurden in einem sterilem Röhrchen bei 400×g über zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Varifuge 3.0, Heraeus Sepatech, Hanau). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die permanenten Zelllinien wurden in RPMI-Medium kultiviert und alle drei Tage 1:3 gesplittet.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. 20 µl Zellsuspension wurden mit 180 µl Trypanblau 0,5% 1:10 verdünnt. Ein Aliquot wurde unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben, lichtmikroskopisch erfolgte dann die Auszählung von vier Quadranten. Ein Quadrant enthält 0,1 µl Zellsuspension.

Zum Einfrieren der Zellen wurden 5×10^6 Zellen in einem Cryoröhrchen in 1 ml Medium aufgenommen und tropfenweise 1 ml Einfriermix zugegeben. Die Cryoröhrchen wurden umgehend für 24 Stunden in einen -80 °C-Tiefkühlschrank gestellt und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff gelagert. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Flüssigstickstoff in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut, dann erfolgte eine tropfenweise Zugabe von vorgewärmtem Medium. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen gezählt und in einer Zellkulturflasche ausplattiert.

Alle Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank (Herasafe 12, Heraeus, Hanau).

3.2.1.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen

Die Zellisolierung erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation. Zur Unterdrückung der Gerinnung wurden 100 ml humanes peripheres Blut sofort nach der Entnahme mit 20 ml ACD gemischt. Das Blut wurde 1:1 mit PBS/1% BSA verdünnt. In einem Röhrchen wurde ein Teil Lymphoprep® (9,6% Metrizamid®; 5,6% Ficoll®) vorgelegt und vorsichtig mit zwei Teilen Blut überschichtet. Die Röhrchen wurden 30 min bei 800×g ohne Bremse zentrifugiert (Bøyum, 1964). Serum wurde aus dem Überstand entnommen und bei 4 °C aufbewahrt. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abpipettiert, mit PBS/1% BSA auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 400×g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml PBS/1% BSA aufgenommen und erneut zentrifugiert. Es wurden insgesamt drei Waschschrte durchgeführt, im Anschluß erfolgte eine Zellzahlbestimmung.

3.2.1.2 Herstellung von CIK-Zellen

Nach der Isolierung mononukleärer Zellen wurden die Zellen in Hepes-Medium aufgenommen und die Zellzahl auf 5×10^6 /ml eingestellt. Die Zellen wurden à 4 ml pro well in 6-Loch-Platten ausgesät und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Der Überstand mit den nicht adhärenzten Zellen wurde durch Spülen gelöst und in Zellkulturflaschen überführt. Die Zelldichte wurde auf 3×10^6 /ml

eingestellt, die Lymphozyten wurden durch Zugabe von 1000 U/ml IFN- γ stimuliert. Am Tag +1 wurden 300 U/ml IL-2, 5 ng/ml anti-CD3 und 100 U/ml IL-1 β zugegeben. Jeden dritten Tag erfolgte eine weitere Zugabe von 300 U/ml IL-2. Die Zelldichte wurde durch Mediumzugabe während der Kultivierung konstant gehalten, Zentrifugationsschritte wurden vermieden (Schmidt-Wolf et al., 1991).

3.2.1.3 Generierung und Pulsen von dendritischen Zellen

Die unter 3.2.1.1 gewonnenen und in 6-Loch-Platten adhärennten Zellen wurden mit 2 ml DC-Medium pro well unter Zugabe von 500 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 kultiviert (Romani et al., 1994). Um eine Stimulation durch im fetalen Kälberserum enthaltene Fremdantigene zu vermeiden, wurden die DC in autologem Serum kultiviert. Die dendritischen Zellen wurden am Tag +1 durch Zugabe von Protein gepulst, bei der Verwendung von Peptiden erfolgte die Zugabe am Tag +5. Am vierten Tag der Kultivierung wurde der Überstand zentrifugiert und in frischem DC-Medium mit Zytokinen (500 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4) aufgenommen.

3.2.1.4 Cokultivierung von CIK-Zellen mit dendritischen Zellen

Am Tag +7 wurden dendritische Zellen mit autologen CIK-Zellen cokultiviert. Die DC eines wells wurden mit einem Gummiwischer gelöst, nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 2 ml DC-Medium resuspendiert und gezählt. Die CIK-Zellen wurden mit 1 ml Hepes-Medium pro well ausgesät, so daß sich ein Stimulator zu Responder Verhältnis von 1:2-1:6 ergab. Die cokultivierten Zellen wurden ab dem Zeitpunkt der Cokultivierung nur noch mit IL-2 stimuliert. Am Tag +14 wurden die CIK-Zellen analysiert.

3.2.1.5 Einzelzellisolierung von Tumorzellen

Die Einzelzellisolierung aus Gewebe erfolgte enzymatisch. Der Tumor wurde mit einem Skalpell in einer Petrischale kleingeschnitten und in 2 mm³ große Stücke zerkleinert. Die so gewonnenen Stücke wurden mit einer sterilen Pinzette in ein 50 ml Röhrchen überführt und 15 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln (200 spm) mit 15 ml Isolationslösung inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und in ein Röhrchen überführt, mit 50 ml PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit zehn Teilen Erythrozytenlyse-Puffer versetzt und inkubiert 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die verbliebenen Tumorstücke wurden erneut mit 15 ml Isolationslösung versetzt und geschüttelt. Es wurden insgesamt drei Isolations- und Erythrozytenlysegänge durchgeführt (Kemmer et al., 1987).

Nach der Erythrozytenlyse wurden die Zellen zentrifugiert. Die Pellets und das nicht isolierte Tumormaterial wurden nacheinander durch ein 100 μ m, 70 μ m und ein 40 μ m Nygonsieb gedrückt. Dafür wurde das jeweilige Nygonsieb auf ein 50 ml Röhrchen gesetzt und mit dem Kolben einer 5 ml Spritze wurde das Material durchgerieben. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10⁷ Zellen/ml in Leibovitz-Medium aufgenommen und ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen 1:2 gesplittet.

3.2.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine Vorkultur von *XL1-Blue MRF⁻ strain* wurde über Nacht angelegt. Die Vorkultur wurde 100fach in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer definierten Zelldichte kultiviert. Die Zelldichte wurde durch Messung der Absorption bei 600 nm mit 1 mm-Küvetten bestimmt und lag bei einer O.D. von 0,6 - 0,9. Die Zellen wurden nach Erreichen der Zelldichte für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 2500 \times g über 5 min bei 4 °C (Sorvall RC-5B,

Krefeld) geerntet, und das Zellsediment in 20 ml eiskalter 50 mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2500×g, 5 min, 4 °C), anschließend in 5 ml eiskalter 50 mM Kalziumchlorid-Lösung und 1 ml 100% Glycerol resuspendiert und für mindestens 3 Stunden auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der kompetenten Zellen (100 µl) auf Eis wurde 1 µg DNA zu der Zellsuspension gegeben und für 45 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 90 sec. ein Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für 45 min bei 37 °C inkubiert. 50 µl der Suspension wurden direkt auf LB-Ampicillin-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Einzelklon gepickt und in 10 ml LB-Medium über 3 Stunden kultiviert, diese Vorkultur wurde in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin überführt und über Nacht bei 37 °C vermehrt.

3.2.2.3 Gentransfer in dendritische Zellen

Der Gentransfer erfolgte mittels UV-inaktiviertem Adenovirus, an das kovalent Poly-L-Lysin gebunden ist (AdV-PLL). Das Adenovirus wurde mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 80-100 eingesetzt, d.h. 80-100 ‚infektiöse‘ Partikel pro Zelle. Ein Transfektionscocktail bestehend aus 29,4 µl HBS; 1 µl Plasmid-DNA (Konzentration 100 µg/ml); und 4,5 µl AdV-PLL wurde lichtgeschützt und in Polystyrol-Röhrchen angesetzt. Der Ansatz inkubierte 30 min bei Raumtemperatur und wurde zwischendurch mehrmals sanft geschüttelt. Zur weiteren Komplexbildung wurden 15,1 µl Poly-L-Lysin zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die dendritischen Zellen (5×10^5 Zellen/well) wurden in 1 ml PBS⁺⁺ aufgenommen, dazu wurde der Transfektionscocktail zugegeben. Die Platte wurde über zwei Minuten bei 200×g zentrifugiert und im Anschluß für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von DC-Medium mit Zytokinen (500 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4). Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt (Cristiano et al., 1993). Gentechnische Abfälle wurden gemäß des Gentechnikrechtes entsorgt.

3.2.2.4 Plasmidherstellung

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll des EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dieses basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) und nutzt die selektive Bindung von Nukleinsäuren an das Qiagen-Anionenaustauscherharz. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt ($[dsDNA \text{ mg/ml}] = 50 \times \text{Verdünnung} \times O.D._{260 \text{ nm}}$), die Reinheit wurde durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm errechnet.

3.2.2.5 RNA-Isolierung

Die präparative Isolierung von RNA wurde nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dieses nutzt die selektive Bindung von RNA an einer Kieselgelmembran. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt ($RNA \text{ [mg/ml]} = 40 \times \text{Verdünnung} \times O.D._{260 \text{ nm}}$), die Reinheit durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm errechnet. Es kam RNA mit einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,1 zur Verwendung.

3.2.2.6 RT-PCR

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA, sowie deren Vermehrung mittels PCR-Technik wurde mittels des SUPERScript™ ONE-STEP™ RT-PCR System (Gibco BRL, Karlsruhe) durchgeführt. Das Programm umfaßte die Schritte: Umschreibung der RNA in cDNA (45 °C, 45 min), Prä-Denaturierung der cDNA (94 °C, 3 min) und daran anschließend 34 Zyklen bestehend aus: Denaturierung (95 °C, 3 min), Annealing (64 °C, 45 sec) und Extension (68 °C, 1min). Abschließend fand eine weitere Extension über 5 min bei 68 °C statt. Die Konzentration an cDNA wurde photometrisch bestimmt (Chomczynski and Sacchi, 1987)

3.2.2.7 Gel-Elektrophorese

Zur horizontalen Gel-Elektrophorese wurde ein 1% Agarosegel mit 2 µg/µl Ethidiumbromid verwendet. 2 µg DNA wurden mit 1/6 Volumen 6× Ladepuffer versetzt und mit Laufpuffer ad 24µl aufgefüllt. Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert, die Auftrennung erfolgte bei 60 V Gleichspannung bei einer Laufzeit von 1,5 Stunden. Zur Größenbestimmung wurde ein Größenmarker mitgeführt. Die Auftrennung wurde unter UV-Licht kontrolliert und fotografisch dokumentiert.

3.2.3 Analytik

3.2.3.1 Zytotoxizitätsnachweis

Es wurde als nicht radioaktive Alternative zum ⁵¹Cr release assay das Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Es mißt mittels einer enzymatischen Reaktion, bei der ein Tetrazoliumsalz in ein Formazanprodukt umgewandelt wird, die quantitative Freisetzung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), welches bei der Zellyse freigesetzt wird (Cook and Mitchell, 1987).

Targetzellen, deren Lyse durch Effektorzellen induziert werden soll, wurden mit 10.000 Zellen pro well in einer 96-Loch-MTP à 100 µl ausgesät. Um einen Hintergrund durch in FCS enthaltenes LDH und als pH-Indikator beigefügtes Phenolrot zu vermeiden, wurde RPMI 160 farblos mit einem Serumgehalt von 2% (Zytotox-Medium) verwendet. CIK-Zellen wurden in 100 µl/well so zugegeben, daß sich Effektor zu Target Verhältnisse im Bereich von 80:1 bis 2,5:1 ergaben. Parallel dazu wurde eine Platte mit Effektorzellen ohne Targetzellen pipettiert, um die Spontanfreisetzung der Effektorzellen zu bestimmen. Die wells wurden mit Zytotox-Medium ad 200 µl/well aufgefüllt. Es wurden jeweils drei gleiche wells pipettiert. In sechs wells wurden Targetzellen ohne Effektorzellen pipettiert, um die Spontanfreisetzung der Targetzellen zu bestimmen. Ebenfalls als Sechsfachbestimmung wurde die Maximalfreisetzung der Targetzellen induziert, indem ein anionisches Detergenz (IGEPAL) 1% zu den Targetzellen gegeben wurde.

Nach einer fünfstündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Platten zentrifugiert (200×g, 7 min). 50 µl Überstand wurden geerntet und in eine neue 96-well-Platte überführt. Zu den Proben wurden 50 µl Substrat zugegeben, die Farbreaktion wurde nach ca. 20 min durch 50 µl einer 1 M Salzsäure/well abgestoppt. Die Extinktion wurde photometrisch bei 492 nm bestimmt. Die Extinktion von Zytotox-Medium wurde als Blank gemessen und von den gemessenen Extinktionen abgezogen. Zytotox-Medium mit 1% IGEPAL wurde als Blank für die maximal lysierten Targetzellen verwendet. Die prozentuale Zytotoxizität berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Lyse [\%]} = \frac{(\text{induzierte Targetfreisetzung} - \text{Effektorspontanfreisetzung}) - \text{Targetspontanfreisetzung}}{\text{Targetmaximalfreisetzung} - \text{Targetspontanfreisetzung}} * 100$$

3.2.3.2 Durchflußzytometrie

In der Durchflußzytometrie können Einzelzellen gemäß ihrer Größe und Granularität dargestellt werden. Durch Zugabe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper können Oberflächenmarker auf den Zellen detektiert werden.

Für jede Färbung wurden 10^5 Zellen geerntet, zentrifugiert und in 100 µl PBS/1% BSA resuspendiert, von Fluorisothiocyanat (FITC) markierten Antikörpern wurden 10 µl, von Phycoerythrin (PE) markierten Antikörpern 5 µl zugegeben, die Zellen inkubierten 15 min auf Eis im Dunkeln. Daran schloß sich ein Waschschrift an, die Zellen wurden dann in 1 ml PBS/1% BSA aufgenommen und innerhalb von 24 Stunden gemessen. Bei der Verwendung unkonjugierter Antikörper (15 µl pro Ansatz) wurde nach dem Waschen ein sekundärer, markierter Antikörper zugegeben, der gegen den Idiotyp des ersten Antikörpers gerichtet ist. Die zweite Inkubation dauerte ebenfalls 15 min, woran sich ein Waschschrift anschloß. Die Messungen wurden am EPICS XL der Firma Coulter-Beckmann, Krefeld durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens 30.000 Zellen gemessen.

3.2.3.3 Dimeruntersuchungen

Mittels der Dimertechnik können T-Zellen, die einen spezifischen Rezeptor exprimieren, durchflußzytometrisch erkannt werden. Die Aminosäuresequenz des Epitops und der HLA-Typ müssen hierfür bekannt sein. Durch Zweitfärbungen können die rezeptorspezifischen Zellen hinsichtlich des Anteiles der zytotoxischen Zellen weiter eingeeengt werden (Greten et al., 1998).

Ein chimeres Protein, bestehend aus einem Immunglobulinanteil und einem HLA-A2-Rezeptoranteil wurde mit HLA-A2 spezifischen Peptid beladen. 10 µl Dimer wurden hierfür mit 3,2 µg Peptid über 14 Tage bei 4 °C beladen. Das Peptid wurde in PBS/0,01% Natriumazid gelöst. Die Färbung nach zytotoxischen T-Zellen und nach Zellen mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor erfolgte leicht modifiziert zum oben beschriebenen Durchflußzytometrieprotokoll. 10^6 CIK-Zellen wurden 40 min mit 10 µl peptidbeladenem Dimer auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde 10 µl anti-Maus IgG1-PE zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert, um den Immunglobulinanteil des Dimers zu detektieren. Nach einem Waschschrift wurden 10 µl anti CD8-FITC (IgG2), der direkt an den Zellen bindet, zupipettiert und weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Das Pellet wurde nach dem Waschen in 500 µl PBS/1% BSA aufgenommen. Es wurden mindestens 100.000 Zellen gemessen. Als Kontrollansatz diente ein Dimer, das mit irrelevantem Protein beladen wurde. Die Einstellungen am Durchflußzytometer wurden so gewählt, daß die Messung mit Dimer, das mit dem irrelevanten Peptid beladen war, dem Nullwert entsprach.

3.2.3.4 ELISpot-Analytik

Die ELISpot-Technik erlaubt es, die Zytokinproduktion einzelner Zellen zu detektieren (Versteegen et al., 1998). Es wurde ein humanes IFN- γ ELISpot Kit (Hölzel, Köln) verwendet. Hierbei werden Zellen auf einer mit monoklonalem Antikörper beschichteten 96-well HATF-Membran-Platte (Millipore, Bedford, MA, USA) ausgesät. Die Zellen werden mit Phytohämagglutinin in einer Konzentration von 20 µg/ml aktiviert. Während einer zweitägigen Inkubation bindet von den Zellen produziertes IFN- γ an den Antikörper und kann nach Entfernen der Zellen durch einen sekundären, biotinylierten Antikörper markiert werden. Streptavidin-alkalische Phosphatase bindet an das Biotin und wird mittels BCIP/NBT Substrat nachgewiesen. Auf der Nylonmembran befinden sich nun blaue Spots, die unter einem Binokular-Mikroskop ausgezählt werden können. Es wurden Zellzahlen zwischen 10^6 und 10^5 /ml eingesetzt.

3.2.3.5 Nachweis transfizierter Zellen

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde ein β -gal-staining kit (Invitrogen, De Schelp, Niederlande) verwendet. Das Kit erlaubt den Nachweis von Zellen, die mit einem Plasmid, das *lacZ* exprimiert, transfiziert worden sind. *LacZ* ist ein bakterielles Gen, das bei eukaryotischen Transfektionen als Reportergen verwendet wird, da das Produkt β -Galaktosidase, proteolytisch nicht abgebaut wird. Transfizierte Zellen können das Substrat X-gal in einen blauen Farbstoff umwandeln. Der Prozentsatz blau gefärbter Zellen wurde lichtmikroskopisch bestimmt.

3.2.3.6 Tumormarkerbestimmung

Die Bestimmung von Tumormarker im Serum wurde freundlicherweise vom Tumormarkerlabor der klinischen Biochemie der Medizinischen Einrichtungen der Universität Bonn durchgeführt. Hierzu wurde die ELECSYS-Methode der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Angewendet wird das Sandwich-Prinzip. Die Probe bildet mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markierten zweiten monoklonalen Antikörper einen Sandwich-Komplex. In der Meßzelle werden die Mikropartikel magnetisch auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert, durch Anlegen elektrischer Spannung wird die Chemolumineszenz Emission induziert, die mittels Photomultiplier gemessen wird.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung von dendritischen Zellen

In Anlehnung an das Romaniprotokoll (Romani et al., 1994) konnte ein Vorgehen zur Generierung von dendritischen Zellen aus Patienten- oder Spenderblut etabliert werden. Die durch Dichtegradientenzentrifugation und Adhäsion an Zellkulturmaterialien gewonnenen Monozyten/Makrophagen zeigten nach Stimulation mit Interleukin-4 und GM-CSF nach wenigen Tagen morphologisch das typische Erscheinungsbild von dendritischen Zellen (siehe Abb. 3). Die Kultivierung der dendritischen Zellen konnte problemlos in autologem Serum durchgeführt werden. Aus 100 ml Blut wurden $5-10 \times 10^7$ adhärenzte Zellen gewonnen. Die Zellzahl nahm im Verlauf der Differenzierung um durchschnittlich 75% ab.

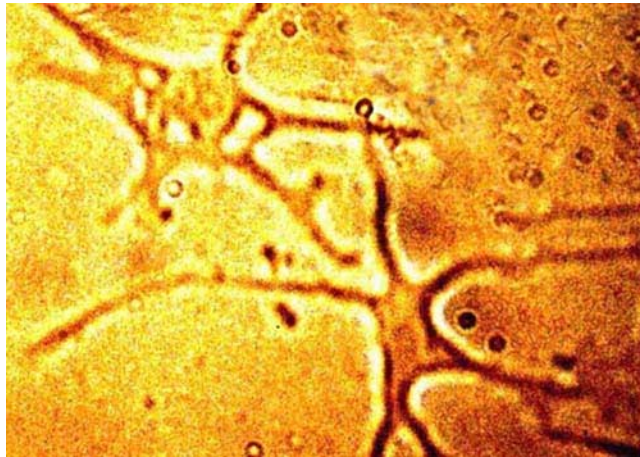


Abbildung 3: Dendritische Zellen an Tag +6 der Kultivierung (fotografiert bei 400facher Vergrößerung)

4.1.1 Durchflußzytometrische Untersuchung dendritischer Zellen

Die nach Zytokinstimulation gewonnenen DC wurden im Durchflußzytometer bezüglich ihrer Oberflächenmerkmale charakterisiert. Dendritische Zellen ließen sich durch das parallele Vorliegen unterschiedlicher Reifegrade in der durchflußzytometrischen Darstellung nur schwer als Population definieren (siehe Abb. 4), konnten aber sicher von $CD14^+$ Monozyten abgegrenzt werden.

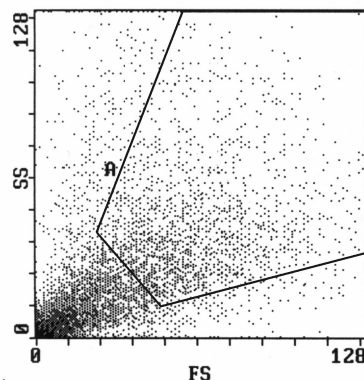


Abbildung 4: Durchflußzytometrische Darstellung dendritischer Zellen (Tag +5)

Um die Reifung der dendritischen Zellen zu verfolgen, wurden die Zellen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt und im Durchflußzytometer gemessen. Es wurden ungepulste, am Tag+1 mit 100ng Humanalbumin/ml gepulste DC, sowie gepulste und ungepulste dendritische Zellen nach Cokultur mit CIK-Zellen untersucht. Dendritische Zellen ließen

sich aufgrund ihrer Größe und Granularität von kokultivierten CIK-Zellen sicher abgrenzen.

Tabelle 1: Expression von Oberflächenmarkern auf dendritischen Zellen

DC-Alter [d] (Cokultur ab Tag +7)	1	3	5	9	11	13
CD1a exprimierende DC	0,4 ± 0,2%	11,1 ± 1,7%	13,5 ± 1,2%	19,2 ± 3,8%	34,8 ± 1,3%	25,7 ± 1,6%
CD1a Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				30,0 ± 1,5%	49,4 ± 3,3%	38,8 ± 1,8%
CMRF-44 exprimierende DC	12,0 ± 1,5%	28,7 ± 3,3%	24,1 ± 3,2%	52,5 ± 2,0%	49,7 ± 4,1%	54,5 ± 3,0%
CMRF-44 Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				60,8 ± 1,8%	51,2 ± 4,5%	55,2 ± 1,8%
CD83 exprimierende DC	8,2 ± 1,0%	21,0 ± 1,9%	11,2 ± 1,1%	24,4 ± 0,9%	35,8 ± 5,8%	35,0 ± 7,0%
CD83 Expression auf stimulierten kokultivierten DC				37,1 ± 0,7%	37,9 ± 5,0%	42,5 ± 0,9%
CD80 exprimierende DC	10,7 ± 1,6%	20,5 ± 0,8%	15,6 ± 3,1%	28,3 ± 0,2%	50,3 ± 0,8%	47,2 ± 4,1%
CD80 Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				45,5 ± 0,7%	54,8 ± 3,1%	56,8 ± 1,3%
CD86 exprimierende DC	35,9 ± 2,3%	28,3 ± 2,1%	32,2 ± 2,8%	42,8 ± 7,9%	57,1 ± 4,3%	52,1 ± 4,0%
CD86 Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				60,8 ± 1,8%	65,8 ± 1,8%	65,3 ± 0,2%
HLA-ABC exprimierende DC	70,7 ± 5,5%	75,2 ± 0,2%	65,6 ± 10,3%	86,5 ± 1,8%	87,9 ± 1,8%	85,4 ± 2,9%
HLA-ABC Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				90,9 ± 0,9%	93,8 ± 0,6%	92,9 ± 0,2%
HLA-DR exprimierende DC	27,9 ± 0,3%	25,3 ± 0,4%	25,5 ± 1,0%	51,2 ± 3,1%	47,9 ± 1,5%	50,9 ± 2,9%
HLA-DR Expression auf stimulierten und kokultivierten DC				75,7 ± 5,4%	85,9 ± 6,1%	79,1 ± 0,5%

Der Anteil dendritischer Zellen, die die untersuchten Oberflächenantigene exprimierten, stieg im Verlauf der Kultivierung stetig an. Auffällig war eine verstärkte Antigenexpression bei dendritischen Zellen, die mit Humanalbumin stimuliert worden waren (Daten nicht gezeigt). Die Kokultivierung von DC mit Effektorzellen bewirkte eine weitere Hochregulation der Oberflächenmarker (Daten nicht gezeigt). Der prozentual größte Anteil antigenexprimierender Zellen konnte nach Stimulation mit Humanalbumin und Kokultivierung mit Effektorzellen detektiert werden. Es wurden drei von einander unabhängige Messungen durchgeführt, es sind die Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

4.2 Zytotoxizität immunologischer Effektorzellen nach Cokultivierung mit gepulsten dendritischen Zellen

Für die Etablierung eines Systems, in dem bei CIK-Zellen durch eine Cokultivierung mit gepulsten dendritischen Zellen zytotoxische Wirkung gegen gastrointestinale Tumorzellen induziert wird, wurde in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) der optimale Zeitpunkt für die Cokultur von autologen CIK-Zellen und DC ermittelt. Eine Cokultivierung sieben Tage nach der Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Blut mit einem Stimulator zu Responder Verhältnis von 1:2 – 1:6 erwies sich hierbei als äquieffektiv. Die Differenzierung der dendritischen Zellen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt unabhängig von einer fortführenden Stimulation mit Interleukin-4 und GM-CSF, so daß auf eine weitere Zytokinstimulation verzichtet werden konnte. Ab dem Zeitpunkt der Cokultur wurde eine Zytokinstimulation nur in Hinblick auf die CIK-Zellen mit Interleukin-2 durchgeführt.

4.2.1 Bestimmung der Tumorantigenexpression der Targetzellen

Es sollte untersucht werden, ob dendritische Zellen durch Pulsen mit Tumorantigenen cokultivierten CIK-Zellen eine spezifische Zytotoxizität vermitteln können. Die verwendeten Zelllinien wurden deshalb vorab hinsichtlich der Expression der Tumorantigene CA 19-9 und CEA durchflußzytometrisch untersucht.

Tabelle 2: Expression von Tumorantigenen

	CA 19-9 Expression	CEA Expression
Colo 201	45,4%	77,3%
Colo 205	64,8%	80,1%
DAN-G	67,9%	4,3%

Aufgrund des Expressionsprofils der Zelllinien wurden für Untersuchungen mit dem Tumorantigen CA 19-9 die Zelllinien Colo 205 und DAN-G eingesetzt. Zytotoxizitätsuntersuchungen nach dem Pulsen mit CEA-Protein bzw. CAP-1 wurden mit Colo 201 und Colo 205 Zellen durchgeführt.

4.2.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen zum Pulsen von dendritischen Zellen mit CA 19-9

In LDH-Freisetzungstests mit der CA 19-9 exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie Colo 205 als Target wurde die Zytotoxizität von nicht cokultivierten CIK-Zellen gegenüber mit dendritischen Zellen cokultivierten CIK-Zellen ermittelt. Des weiteren wurden unbehandelte DC und dendritische Zellen, die mit dem tumor-assoziierten Antigen CA 19-9 gepulst waren eingesetzt. Zum Pulsen wurde CA 19-9 bzw. Myoglobin aus Rinderherz als irrelevantes Protein in gleicher Proteinkonzentration verwendet. Ein Unit CA 19-9 entspricht einer Proteinmenge von 0,25-1ng.

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnte gezeigt werden, daß ein Pulsen von dendritischen Zellen mit Antigen an frühen Tagen (Tag +1, Tag +2) über drei bis vier Tage den später cokultivierten CIK-Zellen die höchste Zytotoxizität vermittelte.

Dendritische Zellen wurden an Tag +1 mit 100 U/ml CA 19-9, bzw. 100 ng/ml Myoglobin über drei Tage gepulst. CIK-Zellen wurden ab Tag +7 cokultiviert. Der LDH-Freisetzungstest wurde an Tag +14 durchgeführt.

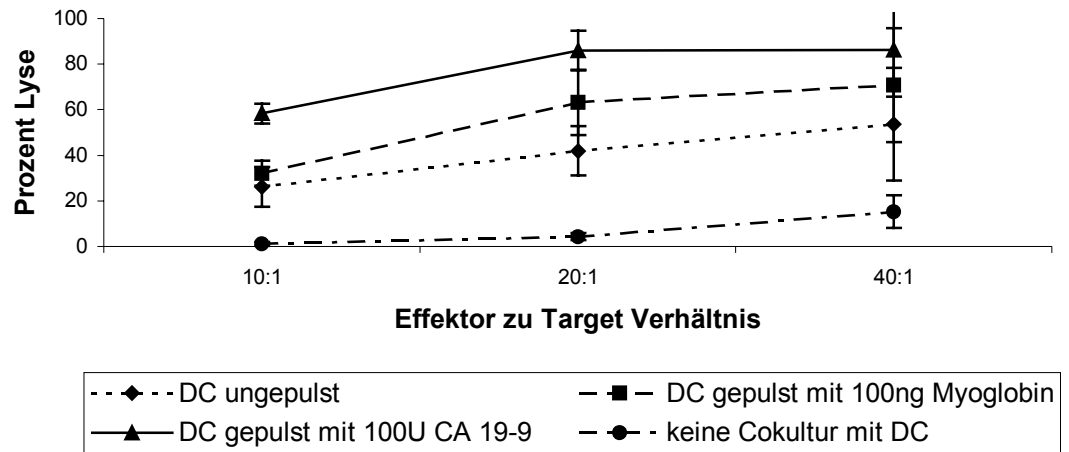


Abbildung 5: Zytotoxische Aktivität von CIK-Lymphozyten gegen Pankreaskarzinomzellen (DAN-G) nach Kokultivierung mit CA 19-9-Protein gepulsten dendritischen Zellen

CIK-Zellen, die nicht kokultiviert worden waren, zeigten gegenüber DAN-G Zellen nur eine sehr geringe Zytotoxizität. Bei einem Überschuß von vierzig CIK-Zellen auf eine Pankreaskarzinomzelle konnte nur eine 15%ige Targetlyse bewirkt werden. Die Kokultivierung mit dendritischen Zellen steigerte die zytotoxische Wirkung auf 53,6%. Das unspezifische Pulsen der dendritischen Zellen mit dem irrelevanten Protein Myoglobin induzierte eine verstärkte Zytolyse der Targetzellen durch die CIK-Zellen von 70,8 %. Nach Kokultur der Effektorzellen mit DC, die mit CA 19-9 gepulst worden waren, wurden 86,2% der Targetzellen lysiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.2.3 Titration von CA 19-9 Protein

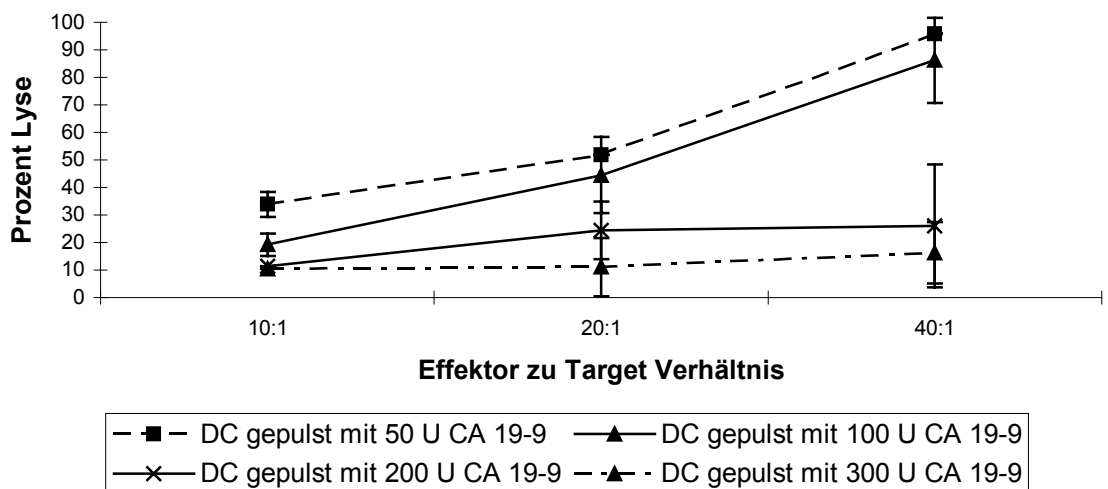


Abbildung 6: Zytotoxische Aktivität von CIK-Lymphozyten gegen DAN-G Zellen nach Kokultivierung mit DC, die mit steigenden CA 19-9 Proteinkonzentrationen gepulst wurden

Eine Titration von CA 19-9 zum Pulsen dendritischer Zellen ergab für den Bereich 50-100 U/ml die höchste vermittelte Zytotoxizität. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.2.4 Pulsen von dendritischen Zellen mit CEA-Protein und CEA-Peptid (CAP-1)

Neben dem Tumorantigen CA 19-9 wurde auch das onkofetale Protein CEA, bzw. das Nonapeptid CAP-1 zum Pulsen dendritischer Zellen eingesetzt. CAP-1 ist als antigene Determinante von CEA beschrieben. In Vorversuchen wurde der optimale Stimulationsbereich von CEA-Protein und Peptid ermittelt (Daten nicht gezeigt), er lag bei 100-500ng CEA pro ml Medium, bzw. bei 0,1-5 µg Peptid. Höhere Konzentrationen erwiesen sich als toxisch bzw. bewirkten keine weitere Zytotoxizitätssteigerung.

Da CAP-1 nur an HLA-A2 positiven Zellen bindet, wurden DC und CIK-Zellen aus dem Blut eines HLA-A2⁺ Spenders isoliert. Dendritische Zellen wurden an Tag +1 mit 100 ng/ml CEA-Protein über drei Tage stimuliert. Beim Pulsen mit Peptid erwies sich ein späteres Pulsen als effektiver (Daten nicht gezeigt), so daß 1 µg/ml CAP-1 an Tag +7 für vier Stunden zugegeben wurde. CIK-Zellen wurden an Tag +7 kokultiviert. Der LDH-Freisetzungstest wurde nach 14 Tagen Kultivierung durchgeführt (Abbildung 7). Der Einsatz von Colo 201 oder Colo 205 Zellen als Zielzellen erbrachte die gleichen Ergebnisse (Daten für Colo 205 Zellen nicht gezeigt). Um antigenunspezifische Effekte zu bestimmen, wurde auch die CEA negative Zelllinie 293 im Zytotoxizitätstest als Target eingesetzt (Abbildung 8).

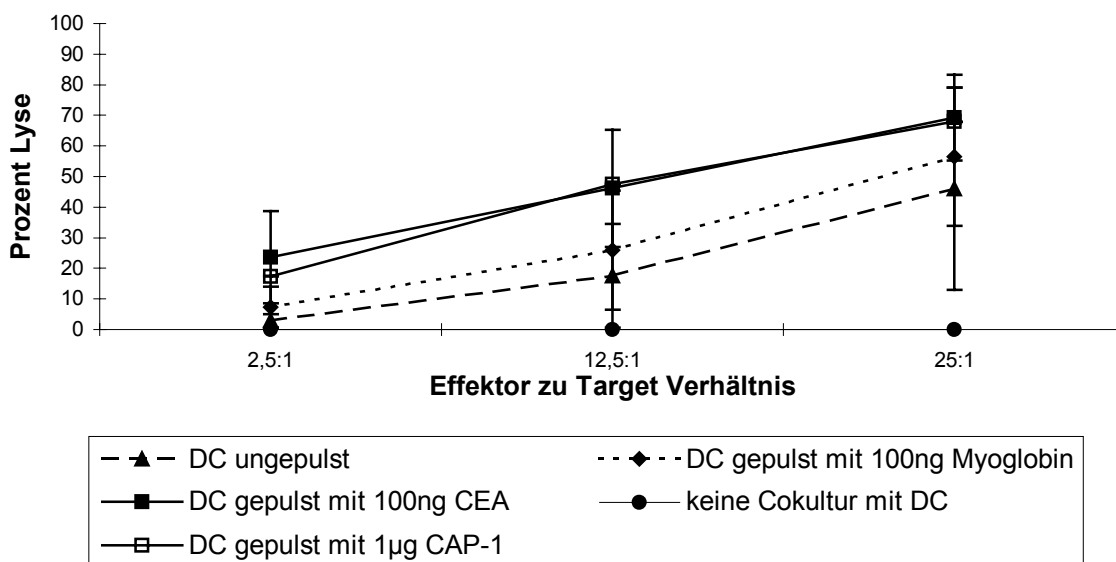


Abbildung 7: Zytotoxizität von CIK-Zellen gegen Colo 201 Zellen nach Kokultivierung mit CEA gepulsten dendritischen Zellen

Die eingesetzten kolorektalen Karzinomzellen erwiesen sich als resistent gegenüber CIK-Zellen. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 25:1 waren CIK-Zellen nicht in der Lage Colo 201 Zellen zu lysieren. Durch die Kokultivierung mit ungepulsten dendritischen Zellen konnten hingegen bis zu 46% der Targetzellen lysiert werden. Eine unspezifische Stimulation durch Zugabe von Myoglobin steigerte die Zytotoxizität auf 56,5%. Die Verwendung von Tumorantigenen zum Pulsen der dendritischen Zellen steigerte die lytische Wirkung der kokultivierten CIK-Zellen. Mit CEA gepulste DC vermitteln eine Lyse von 69,2%, damit konnte durch das Pulsen mit Gesamtprotein die gleiche Zytotoxizität vermittelt werden, wie durch die Beladung der DC mit definiertem Peptid. Die Zugabe von CAP-1 an Tag +7 zu den DC bewirkte eine Tumorzellyse von 67,9% hervorgerufen durch die kokultivierten Effektorzellen. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

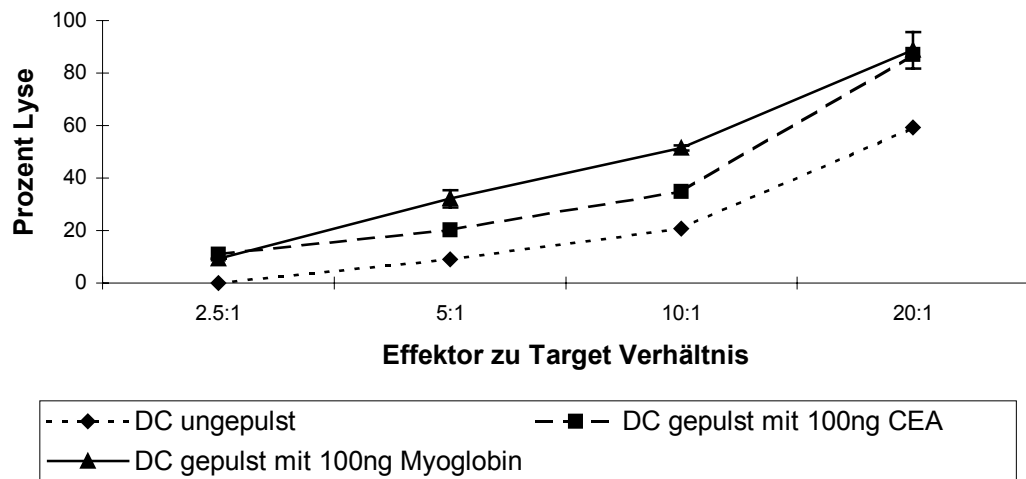


Abbildung 8: Zytotoxizität von CIK-Zellen gegen 293 Zellen nach Kokultivierung mit CEA gepulsten dendritischen Zellen

Die eingesetzte embryonale Nierenzelllinie 293 konnte durch immunologische Effektorzellen lysiert werden. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 konnten kokultivierte CIK-Zellen bereits 59,2% der Targetzellen lysieren. Eine unspezifische Stimulation durch Zugabe von Myoglobin steigerte die Zytotoxizität auf 88,7%. Die Verwendung von Tumorantigenen zum Pulsen der dendritischen Zellen bewirkte keine weitere Zunahme der Zytotoxizität, sondern vermittelte sogar eine leicht geringere Zytotoxizität, als das Pulsen mit Myoglobin, bei einem 20fachen Effektorüberschuß lag sie bei 87,2%. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.2.5 Antikörperblockade von Tumorantigenen auf den Targetzellen

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Targetzellyse spezifisch durch die Stimulation der dendritischen Zellen mit Tumorantigenen vermittelt worden ist, wurden die Tumorantigene auf den Zielzellen mittels Antikörper der Zellerkennung entzogen. Monoklonaler Antikörper gegen CA 19-9 ($3,13 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) wurde am Tag des Zytotoxizitätstests 15 min vor Zugabe der Effektorzellen zu DAN-G Zellen zugegeben. Ungebundener Antikörper wurde durch einen Waschschritt entfernt. Der LDH-Freisetzungstest wurde ansonsten unverändert durchgeführt.

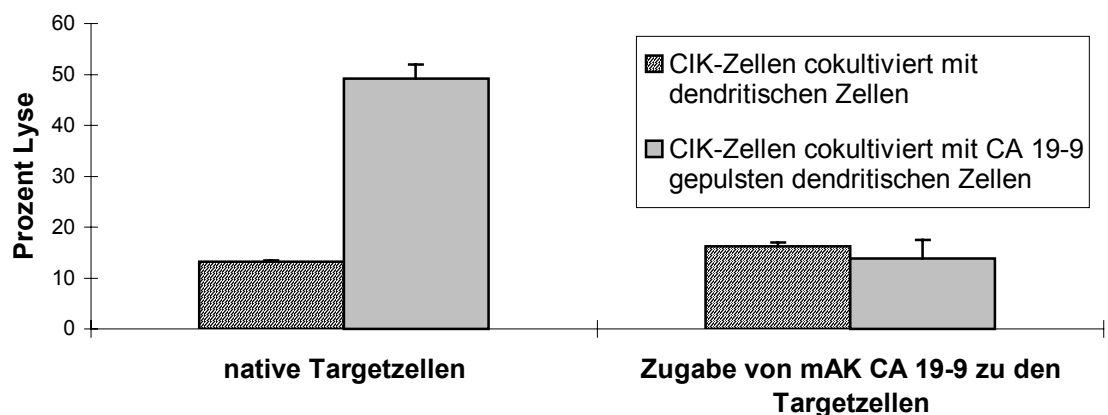


Abbildung 9: Blockade von CA 19-9 auf DAN-G Zellen zum Nachweis einer spezifischen Aktivierung mit gepulsten DC kokultivierter CIK-Zellen

Die unspezifische CIK-Zellaktivierung, hervorgerufen durch die Cokultivierung mit ungepulstem dendritischen Zellen blieb durch die Antikörperzugabe unverändert (bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 lag sie ohne mAK-Zugabe bei 13,2%, nach mAK-Zugabe bei 16,3%. CIK-Zellen, die nach der Cokultur mit CA 19-9 gepulsten dendritischen Zellen eine Zytotoxizität von 49,1% aufwiesen, konnten bei Blockade des Tumorantigenes auf den Zielzellen nur noch 13,8% lysieren, der Wert lag somit in Höhe der unspezifisch vermittelten Zellyse. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.3 Einfluß tumormarkerhaltigen Serums von Karzinompatienten bei der Kultivierung dendritischer Zellen auf die Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen

Es wurde untersucht, ob im Serum von Tumorpacienten antigene Substanzen enthalten sind, die zur Stimulation von dendritischen Zellen genutzt werden können. Dendritische Zellen wurden hierfür in DC-Medium mit 10% Patientenserum kultiviert. Das Serum wurde nicht, wie sonst in der Zellkultur üblich, hitzeinaktiviert. Die in den folgenden Versuchen verwendeten Seren stammten von Karzinompatienten, die entweder einen erhöhten CA 19-9 Spiegel oder CEA-Spiegel aufwiesen.

Es wurden Vorversuche durchgeführt, um auszuschließen, daß eine Antigenität der Seren durch ihren allogenen Charakter bedingt ist. Es konnte gezeigt werden, daß die Verwendung allogener Seren von gesunden Spendern im Kultivierungsmedium keinerlei Einfluß auf die vermittelte Zytotoxizität zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies war unabhängig davon, ob die Seren einer vorhergehenden Hitzeinaktivierung unterworfen worden waren, oder nicht.

4.3.1 Kultivierung dendritischer Zellen mit Seren von Patienten mit erhöhtem Tumormarkerspiegel

Dendritische Zellen wurden entweder in 10% allogenem unbehandeltem Serum von Karzinompatienten, oder 10% allogenem unbehandeltem Serum eines gesunden Spenders kultiviert. Der durchschnittliche CA 19-9 Spiegel im Kulturmedium lag bei 250 U/ml. Die DC wurden bis zur Kokultivierung an Tag +7 in dem Serum kultiviert. LDH-Freisetzungstests mit der Kolonkarzinomzelllinie Colo 205 als Zielzellen wurden an Tag +14 durchgeführt.

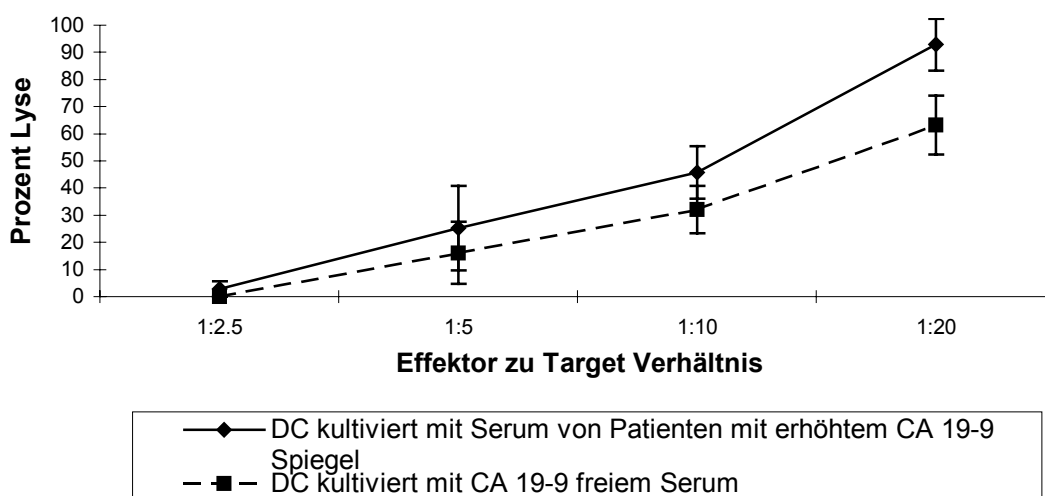


Abbildung 10: Einfluß tumormarkerhaltigen Serums bei der Kultivierung von DC auf die Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen gegen Colo 205 Zellen

Die Kultivierung dendritischer Zellen in Medium mit 10% tumormarkerhaltigem Serum vermittelte kokultivierten CIK-Zellen eine höhere Zytotoxizität, als die Kultivierung im Serum gesunder Spender. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 machte dies einen Unterschied in der Targetzellyse von 92,8% versus 63,2% aus. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier voneinander unabhängigen Experimenten.

Versuche mit CEA enthaltendem Serum erbrachten ähnliche Ergebnisse. Als Targetzelllinien im Zytotoxizitätstest wurden bei Kultivierung in Serum mit erhöhtem CEA Spiegel die CEA positiven Zelllinien Colo 201 und Colo 205 eingesetzt.

4.3.2 Titration tumormarkerhaltigen Patientensерums

Es wurden LDH-Freisetzungstests durchgeführt, in denen untersucht wurde, ob die immunstimulierende Wirkung des Serums von Pankreaskarzinom-Patienten titrierbar ist. Unbehandeltes Serum wurde in den angegebenen Konzentrationen im Kultivierungsserum eingesetzt. Konzentrationen >50% erwiesen sich als nicht praktikabel. Der CA 19-9 Spiegel der verwendeten Seren lag zwischen 50-250 U/ml. Die dendritischen Zellen blieben bis zur Kokultivierung mit CIK-Zellen an Tag +7 in DC-Medium mit Patientensерumzusatz. Der Zytotoxizitätstest wurde an Tag +14 durchgeführt.

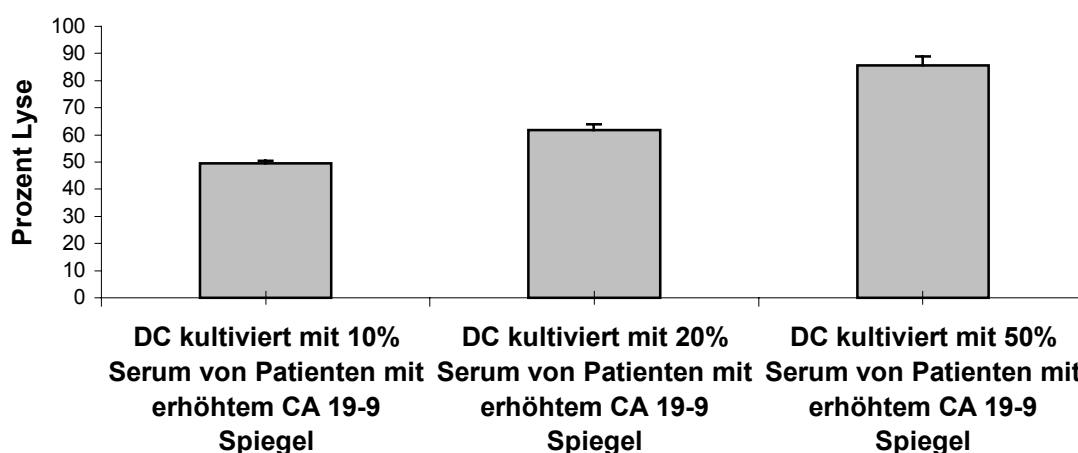


Abbildung 11: Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen gegen DAN-G Zellen, nach Titration tumormarkerhaltigen Serums bei der Kultivierung dendritischer Zellen (Effektor zu Target Verhältnis 10:1)

Es ergab sich eine vermehrte Lyse von DAN-G Zellen in Abhängigkeit vom Serumanteil am Kultivierungsserum der dendritischen Zellen. Die Verwendung von 10% Serum bewirkte eine durch CIK-Zellen vermittelte Lyse von 49,5%, die Lyse stieg bei 20% Serum auf 61,7% und erreichte bei 50% Serumanteil im Medium ein Maximum vom 85,6%. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Einfluß der Serumhitzeinaktivierung

Es wurde untersucht, ob eine Hitzeinaktivierung Auswirkung auf die immunstimulierende Wirkung tumormarkerhaltigen Serums hat. In Analogie zu der in der Zellkultur üblichen FCS-Hitzeinaktivierung, wurde das Patientensерum 30 min bei 56 °C erwärmt.

Es wurden mononukleäre Zellen aus dem Blut von Pankreaskarzinom-Patienten isoliert. Nach siebentägiger Kultur der dendritischen Zellen in 10% autologem Serum wurden die parallel generierten autologen CIK-Zellen kokultiviert. Der Zytotoxizitätstest wurde nach 14 Tagen Kultur mit DAN-G Zellen als Target durchgeführt.

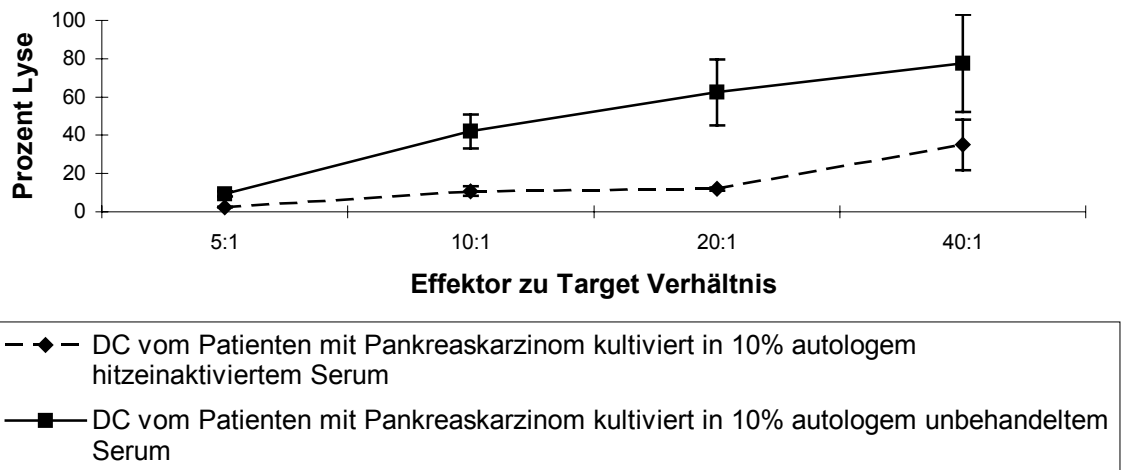


Abbildung 12: Einfluß einer Serumhitzeinaktivierung auf die Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen von Patienten mit Pankreaskarzinom gegen DAN-G Zellen nach Kultivierung autologer dendritischer Zellen in tumormarkerhaltigen Serum

Auch dendritische Zellen von Patienten mit Pankreaskarzinom erwiesen sich ebenfalls als potente Stimulatoren von autologer Effektorzellen. Durch die Kokultivierung von CIK-Zellen mit ungepulsten DC ließ sich bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 40:1 eine 35%ige Lyse von Pankreaskarzinomzellen vermitteln. Die Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen konnte durch die Verwendung von unbehandeltem tumormarkerhaltigen Serums bei der Kultivierung dendritischer Zellen stark gesteigert werden und lag bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 40:1 bei 77,7%. Der stimulierende Wirkstoff im Serum erwies sich somit als hitzelabil. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

4.3.4 Pulsen von dendritischen Zellen mit definierten Tumormarkerkonzentrationen, enthalten im Serum von Karzinompatienten

Zur Tumormarkerbestimmung wurde die ELECSYS®-Methode verwendet. Die hierbei verwendeten Antikörper detektieren auch denaturiertes Protein (persönliche Mitteilung der Firma), so daß der Gehalt an nativem Tumormarker nach erfolgter Hitzeinaktivierung nicht zuverlässig bestimmt werden konnte. Um die These zu untermauern, daß es sich bei dem hitzelabilen Stoff im Serum um CA 19-9 handelt, wurden zur Kultivierung DC-Medien verwendet, die durch Zugabe von Patientenserumproben eine Endkonzentration von 100 U/ml CA 19-9 aufwiesen. Es wurde Serum von drei verschiedenen Patienten eingesetzt. Der prozentuale Serumanteil am Kulturmedium lag zwischen 5 und 30%. Die Kultivierung der dendritischen Zellen mit Patientenserum erstreckte sich bis Tag+7, die Zytotoxizität wurde an Tag +14 bestimmt. Zum Vergleich wurden CIK-Zellen mit gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert, die in DC-Medium mit 10% tumormarkerfreiem Serum kultiviert worden waren. Die dendritischen Zellen wurden an Tag +1 mit 100 U/ml CA 19-9 über drei Tage gepulst.

Tabelle 3: Tumormarkerhaltiges Serum in einer Endkonzentration von 100 U/ml CA 19-9 im Kultivierungsmedium von DC. Gemessen wurde die Zytotoxizität von kokultivierten CIK-Zellen gegen CA 19-9 positive Targetzellen. Angegeben ist die prozentuale Targetzellyse.

Effektor zu Target Verhältnis:	2,5:1	5:1	10:1	20:1	Serumgehalt im Kulturmedium
DC gepulst mit 100 U/ml CA 19-9 enthalten im Serum von Patient 1	6,8%	17,5%	42,2%	80,7 %	5,3%
DC gepulst mit 100 U/ml CA 19-9 enthalten im Serum von Patient 2	11,3%	20,8%	46,9%	83,9 %	18,9%
DC gepulst mit 100 U/ml CA 19-9 enthalten im Serum von Patient 3	6,5%	18,4%	37,2%	78,4 %	29,6%
Mittelwert ± Standardabweichung	8,2 ± 2,2%	18,9 ± 1,4%	42,1 ± 3,9%	81,0 ± 2,3%	
DC gepulst mit 100 U/ml CA 19-9 (Protein)		21,8%	58,3%	86,0 %	10% tumormarkerfreies Serum

Bei der Stimulation dendritischer Zellen mit dem Serum von Patienten mit Pankreaskarzinom korrelierte die im LDH-Freisetzungstest ermittelte Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen mit dem Serumgehalt an CA 19-9. Das Pulsen der DC durch Kultivierung in Serum mit einer Endkonzentration von 100 U/ml CA 19-9 vermittelte in allen drei Fällen den kokultivierten CIK-Zellen die gleiche Zytotoxizität ($p < 0,002$). Der prozentuale Serumgehalt am Kultivierungsmedium hatte keinen Einfluß auf die vermittelte Zellyse. Effektorzellen, die mit dendritischen Zellen kokultiviert worden waren, die mit 100 U/ml exogenem CA 19-9 gepulst und in dem Serum gesunder Spender kultiviert worden waren, erwiesen sich als annähernd gleich lytisch.

4.3.5 Kultivierung in tumormarkerhaltigen Serum und zusätzliches Pulsen mit exogenem Protein

Um noch höhere Zytotoxizitäten zu induzieren, wurden dendritische Zellen mit exogenem Tumormarker gepulst und zusätzlich in autologem Serum von Tumorpatienten kultiviert. Dendritische Zellen von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden entweder in hitzeinaktiviertem autologem Serum oder in unbehandeltem Serum kultiviert. Ein Teil der DC wurde an Tag +1 mit 200 ng/ml CEA-Protein bzw. 100 ng/ml Myoglobin über drei Tage gepulst. Die Kokultur der CIK-Zellen begann an Tag +7, die Zytotoxizität mit Colo 201 Zellen als Targetzellen wurde an Tag +14 bestimmt.

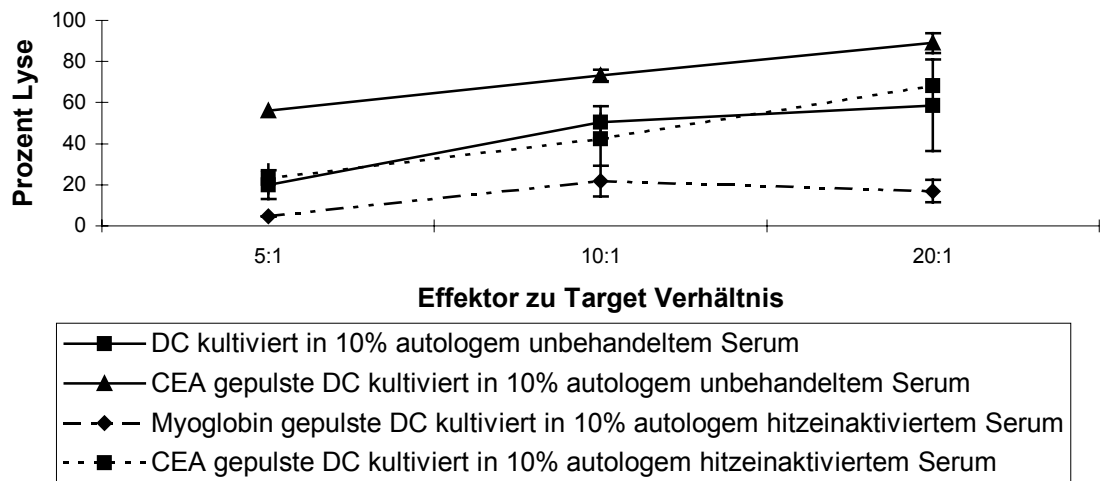


Abbildung 13: Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen gegen Colo 201 Zellen, nach zusätzlichem Pulsen der DC mit exogenem CEA und Kultivierung in Serum von Patienten mit CRC

Ein Pulsen der dendritischen Zellen mit exogenem Protein, zusätzlich zu der Kultivierung in Medium mit tumormarkerhaltigem Serum, konnte eine noch stärkere Zytotoxizität induzieren. Effektorzellen, die mit in hitzeinaktiviertem Serum und unspezifisch gepulsten DC, kokultiviert wurden, konnten lediglich 17,0% der Targetzellen lysieren (Effektor zu Target Verhältnis 20:1). Die Kultivierung in unbehandeltem Serum vermittelte, ohne zusätzliches Pulsen, eine Lyse von 58,7% und lag somit annähernd gleich hoch, wie nach dem Pulsen mit exogenem CEA-Protein (68,1%). Eine Zugabe von exogenem CEA-Protein bei der Kultivierung in tumormarkerhaltigem Serum ließ die Lyse auf 88,9% ansteigen.

Fünf weitere Experimente, in denen anstelle von CEA CA 19-9 und CA 19-9-haltiges Serum eingesetzt wurde, erbrachten ähnliche Ergebnisse. Die Lyse von CA 19-9 positiven Zellen stieg bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 von 82,9% nach Kultivierung in unbehandeltem Serum auf 95,3% bei zusätzlichem Pulsen, an (Daten nicht gezeigt).

4.4 Einsatz immunologischer Effektorzellen von Patienten mit kolorektalen Tumoren im Zytotoxizitätsassay gegen autologe Tumorzellen

Es war möglich, aus dem Blut von Patienten mit Pankreas oder kolorektalem Karzinom dendritische Zellen und CIK-Zellen zu generieren, die in LDH-Freisetzungstests gegen Zelllinien Zellysen, vergleichbar denen der von Zellen gesunder Spender, bewirkten (Abbildung 12).

Durch die Etablierung von Primärkulturen aus Tumormaterial von Patienten mit kolorektalen Tumoren, konnte auch komplett autologe Ansätze untersucht werden. Hierbei wurden dendritische Zellen in autologem unbehandeltem Serum kultiviert, autologe CIK-Zellen wurden kokultiviert und anschließend hinsichtlich ihrer lytischen Aktivität gegen autologe Tumorzellen untersucht.

Bei der Etablierung von Tumorzelllinien aus frisch entnommenem Tumormaterial erwies sich das kolorektale Karzinom wegen der physiologischen Darmflora als problematisch. Die bakterielle Mischflora wurde mittels eines Breitbandantibiotikums abgetötet oder zumindest statisch gehalten. Bemühungen feste Zelllinien aus dem Tumormaterial zu erstellen scheiterten meist an der Überwucherung der Kultur mit Fibroblasten, die ca. 4-6 Wochen nach der Einzelzellisolierung die Tumorzellen verdrängten. Die im Zytotoxizitätstest eingesetzten Tumorzellen hatten einen Fibroblastenanteil <15% und zeigten morphologisch das typische Aussehen kolorektaler Tumorzellen. Durchschnittlich 40% der entnommenen Tumore ließen sich unter Kulturbedingungen zum Wachstum bringen. Pankreastumore wurden wegen ihrer geringen Verfügbarkeit nicht untersucht.

4.4.1 Immunologische Zellen von Patienten mit erhöhtem CA 19-9 Spiegel

CIK-Zellen von zwei Patienten mit Rektumkarzinom wurden mit autologen dendritischen Zellen kokultiviert und im LDH-Freisetzungstest gegen autologe Tumorzellen untersucht. Die dendritischen Zellen wurden in 10% autologem Serum kultiviert und an Tag +1 mit exogenem CA 19-9 über drei Tage gepulst. Der Serumspiegel der Patienten an CA 19-9 lag bei 156 U/ml bzw. 346 U/ml.

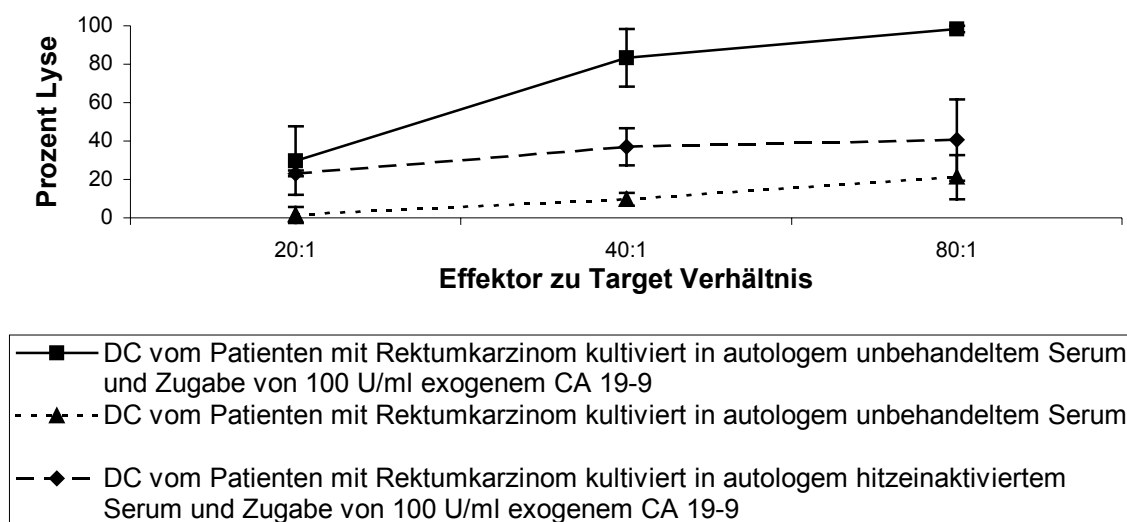


Abbildung 14: Zytotoxizität von CIK-Zellen nach Kokultivierung mit CA 19-9 gepulsten autologen dendritischen Zellen gegen autologe Tumorzellen von Patienten mit Rektumkarzinom

Die vorab erhobenen Ergebnisse bezüglich der Zytotoxizitätssteigerung von CIK-Zellen durch Kokultivierung mit dendritischen Zellen, sowie die weitere Steigerung durch Pulsen mit CA 19-9 und durch Kultivierung in tumormarkerhaltigem Serum konnten auch im komplett autologem

System reproduziert werden.

Nicht kokultivierte CIK-Zellen waren nicht in der Lage autologe Tumorzellen zu lysieren. Die Kokultivierung mit dendritischen Zellen vermittelte den Effektorzellen eine Zytotoxizität von 21,2% bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 80:1. Das Pulsen mit CA 19-9 steigerte die Zellyse auf 40,6%, nach Kultivierung der DC in unbehandeltem tumormarkerhaltigem Serum auf sogar 98,3%. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.4.2 Immunologische Zellen von Patienten mit erhöhtem CEA Spiegel

CIK-Zellen von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden mit autologen dendritischen Zellen kokultiviert und im LDH-Freisetzungstest gegen autologe Tumorzellen untersucht. Die dendritischen Zellen wurden in 10% autologem Serum kultiviert und an Tag +1 mit exogenem CEA-Protein über drei Tage gepulst. Der Serumspegel der Patienten an CEA lag bei 18,4 bzw. 35 ng/ml Serum.

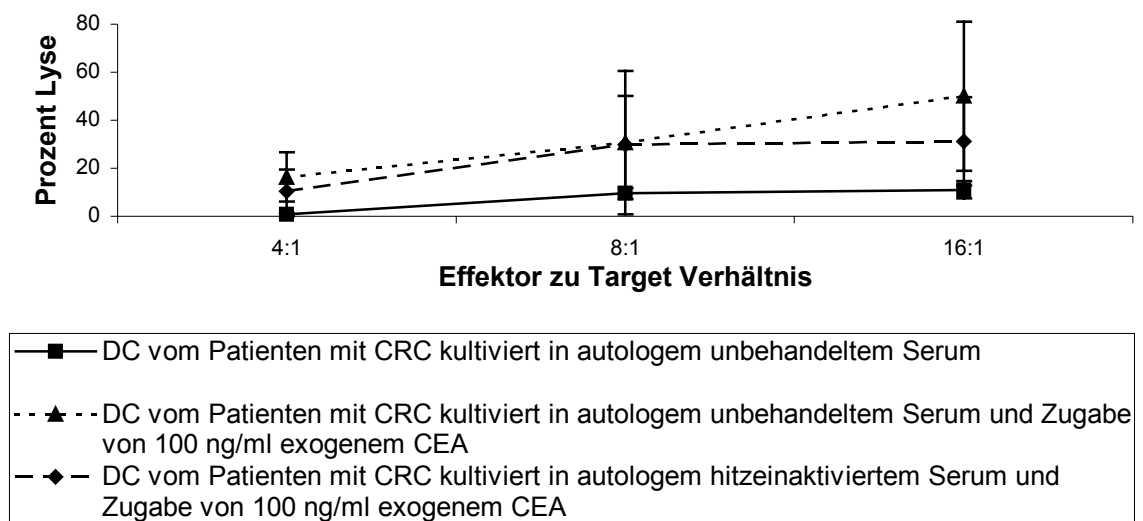


Abbildung 15: Zytotoxizität von CIK-Zellen nach Kokultivierung mit CEA gepulsten autologen dendritischen Zellen gegen autologe Tumorzellen von Patienten mit CRC

Die hinsichtlich CA 19-9 positiver Tumoren gemachten Beobachtungen konnten auch für CEA exprimierende Tumoren bestätigt werden. Nicht kokultivierte CIK-Zellen waren nicht in der Lage autologe Tumorzellen zu lysieren. Bei der verwendeten niedrigen Effektor zu Target Verhältnis waren auch mit ungepulsten DC kokultivierte CIK-Zellen nicht in der Lage den autologen Tumor zu lysieren (Daten nicht gezeigt). Die Kultivierung in unbehandeltem CEA enthaltendem Serum vermittelte eine Zellyse von 11,0%, durch Pulsen mit CEA Protein stieg die Zytotoxizität auf 31,1% bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 16:1. Die Kultivierung in autologem Serum kombiniert mit einem Pulsen mit CEA an Tag +1 steigerte die Zellyse auf 50,0%. Das Pulsen mit CA 19-9 brachte bei diesem Ansatz keine verbesserte Lyse (Daten nicht gezeigt). Der Serumspegel der Patienten an CA 19-9 lag im Normalbereich. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.5 Phänotypische und funktionelle Veränderungen von CIK-Zellen durch die Kokultivierung mit dendritischen Zellen

Es wurde untersucht, ob der gesteigerten Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen meßbare Veränderungen der Effektorzellen zugrunde liegen. Während der Kokultivierung mit dendritischen Zellen konnte eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden. Während bei nicht kokultivierten CIK-Zellen zwischen Tag +7 und Tag +14 nur eine geringe Proliferation verzeichnet wurde, verdoppelten sich kokultivierte Effektorzellen im gleichen Zeitraum.

4.5.1 Expression von T-Zellmarkern auf CIK-Zellen

Durchflußzytometrisch wurde bestimmt, ob es durch die Kokultivierung von CIK-Zellen mit dendritischen Zellen zu einer Veränderung des Anteiles von Helfer- und zytotoxischen Zellen an den $CD3^+$ Zellen kommt.

CIK-Zellen wurden nativ bzw. nach Kokultur mit dendritischen Zellen untersucht. Dendritische Zellen wurden an Tag +1 mit 100ng Myoglobin unspezifisch über drei Tage gepulst. Die Kokultivierung von CIK-Zellen mit autologen dendritischen Zellen erfolgte an Tag +7.

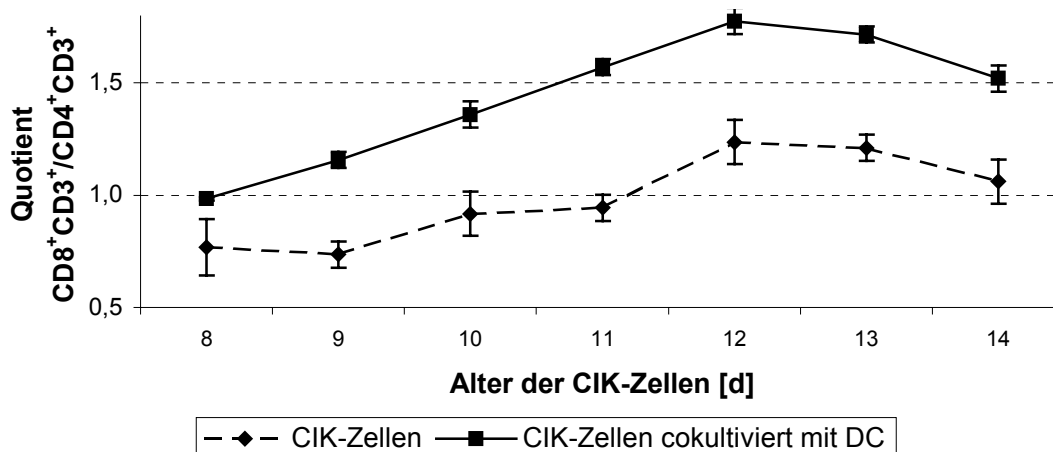


Abbildung 16: Einfluß einer Kokultivierung mit DC auf den Quotienten $CD8^+CD3^+/CD4^+CD3^+$ bei CIK-Zellen

Während der Kultivierung von CIK-Zellen kam es zu einem Anstieg des prozentualen Anteiles zytotoxischer Zellen. Die Kokultivierung von CIK-Zellen mit dendritischen Zellen bewirkte eine weitere Verschiebung der Population in Richtung zytotoxische Zellen. Der Quotient $CD8^+CD3^+/CD4^+CD3^+$ bei CIK-Zellen stieg durch die Kokultur mit dendritischen Zellen hoch signifikant an ($p = 0,00008$). So stieg der Quotient an Tag +10 von 0,92 bei nativen CIK-Zellen auf 1,36 bei kokultivierten Effektorzellen und erreichte mit einem Wert von 1,77 an Tag +12 sein Maximum. Die Daten zeigen die Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Messungen.

4.5.2 Blockade von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen

Um die Bedeutung der T-Zellpopulationen für die induzierte Zytotoxizität zu ermitteln, wurden die MHC-Expression auf den dendritischen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von monoklonalen Antikörper gegen HLA-ABC bzw. HLA-DR blockiert. Im Zytotoxizitätsassay wurde untersucht, welche Auswirkungen die Blockade von MHC Klasse I und MHC Klasse II-Molekülen

auf dendritischen Zellen auf die kokultivierten CIK-Zellen hat. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 µl Antikörper zugegeben. Um etwaige antigene Wirkungen der Antikörper, bzw. zytopathische Effekte durch die Fluoreszenzmarkierung der Antikörper zu kompensieren, wurde monoklonaler Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen (anti-Maus IgG1-FITC) an Tag +6 zugegeben. Die dendritischen Zellen wurden an Tag +1 mit 100 ng/ml Myoglobin über drei Tage stimuliert, die Kokultivierung der CIK-Zellen begann an Tag +7, der LDH-Freisetzungstest wurde an Tag +14 durchgeführt.

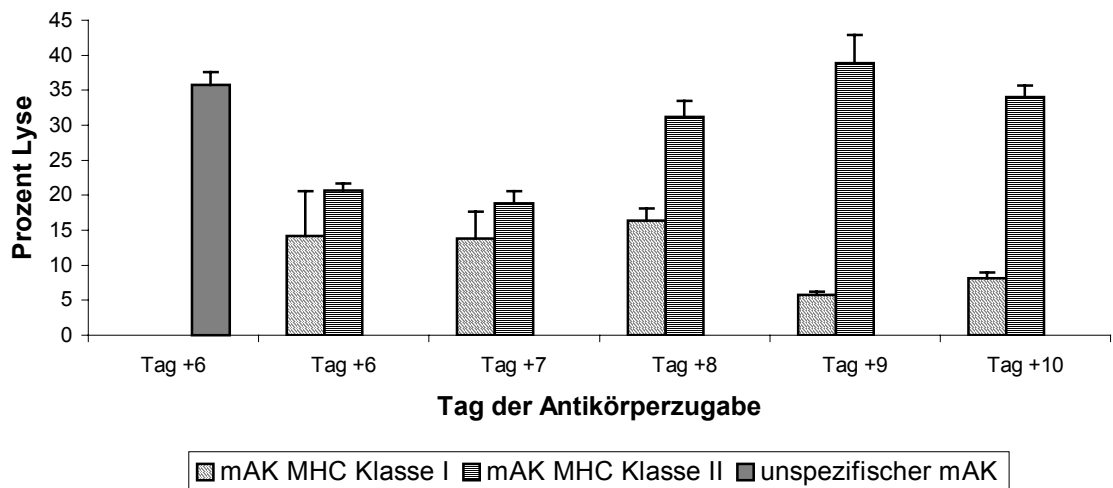


Abbildung 17: Blockade der MHC-Expression auf DC durch Antikörperzugabe an verschiedenen Tagen. Kokultivierte CIK-Zellen wurden im Zytotoxizitätstest in einem 20fachen Überschuß gegen Colo 205 Zellen eingesetzt

CIK-Zellen zeigen nach Kokultur mit unspezifisch gepulsten dendritischen Zellen eine zytotoxische Wirkung gegen Colo 205 Zellen. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 wurden 35,7% der Zielzellen lysiert. Die Zugabe von Antikörper gegen MHC Klasse I-Moleküle zu den dendritischen Zellen bewirkte eine verminderte Zytotoxizität der Effektorzellen, wobei sich dieser Effekt bei späterer Zugabe des Antikörpers stärker ausprägte. Eine Blockade der MHC Klasse I-Moleküle an Tag +6 verminderte die lytische Wirkung von 35,7% auf 14,2%, nach Zugabe des mAK an Tag +9 lysierten kokultivierte CIK-Zellen nur noch 5,7% der Targetzellen.

Bei der Blockade der MHC Klasse II-Moleküle ließ sich ebenfalls eine Bedeutung des Zeitpunktes der Antikörperzugabe aufzeigen, allerdings bewirkte hier eine Blockade an frühen Tage eine stärkere Verminderung der Zytotoxizität, wohingegen die Zugabe von mAK an späten Tagen keine reprimierende Wirkung zeigte. Die Zugabe des Antikörpers an Tag +6 senkte die lytische Wirkung von 35,7% auf 20,7%. DC, deren MHC Klasse II-Moleküle an Tag + 10 blockiert wurden, konnten bei kokultivierten CIK-Zellen eine zytotoxische Wirkung von 34,0% induzieren, dieser Wert liegt im Bereich der Kontrollgruppe. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.5.3 Durchflußzytometrische Daten zur T-Zellrezeptorspezifität kokultivierter CIK-Zellen

Der Einsatz von Dimeren in der Analytik ermöglicht es, den Anteil an antigenspezifischen T-Zellen einer Population zu bestimmen. Ein Dimer bestehend aus einem Immunglobulin-G1 und dem C-Terminus eines HLA-A2 Moleküls wird mit dem zu untersuchenden Antigen inkubiert. Unter der Voraussetzung, daß das Peptid HLA-A2 bindend ist, kommt es zur Ausbildung eines Komplexes, der spezifisch an den T-Zellrezeptor von antigenerkennenden T-Zellen bindet. Der Immunglobulinanteil des Dimers kann dann mittels eines markierten Antikörpers detektiert werden.

Die T-Zellen können durch den Einsatz weiterer Antikörper genauer charakterisiert werden.

Hier wurde die Fragestellung behandelt, ob bei CIK-Zellen die mit spezifisch gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden sind, ein vermehrtes Auftreten von antigenspezifischen T-Zellen zu beobachten ist.

Um unspezifische Bindungen zu erkennen, wurde Dimer mit einem irrelevanten Peptid beladen. Als irrelevantes Peptid wurde das HLA-A2 bindende Peptid PepCD19 gewählt, für das keine spezifischen T-Zellrezeptoren zu erwarten sind (CD19 ist ein B-Zellmarker).

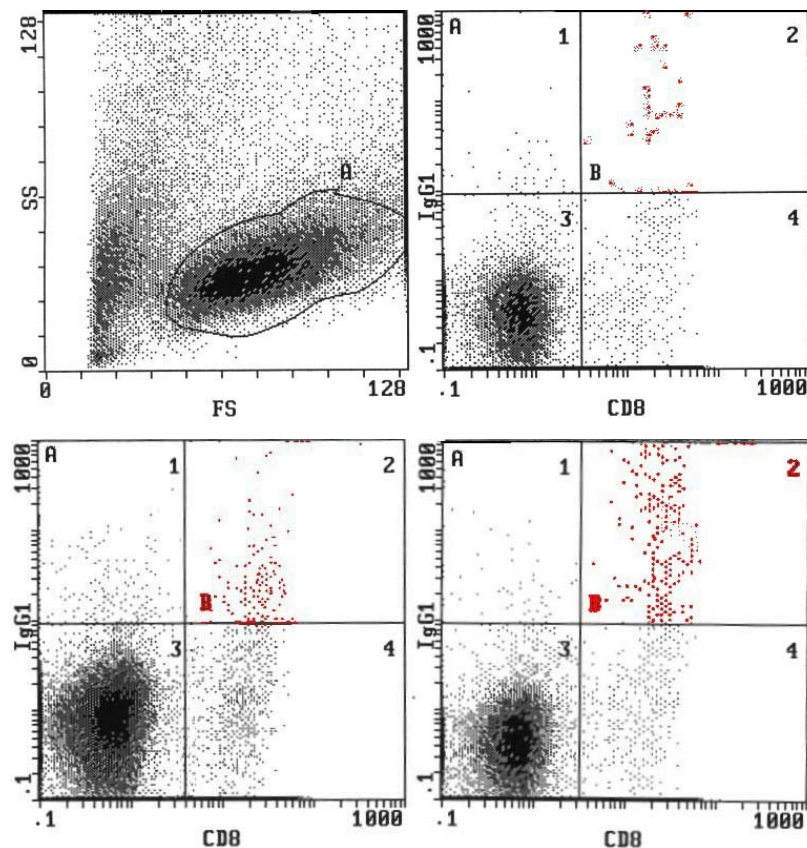


Abbildung 18: Durchflußzytometrische Bestimmung der T-Zellrezeptorspezifität mit gepulsten dendritischen Zellen kokultivierter CIK-Zellen. Zytotoxische T-Zellen, mit dem Phänotyp $CD8^+$ wurden durch FITC-Färbung ermittelt. Es wurde die in 'A' isolierte Lymphozytenpopulation untersucht. Das rechte Bild in der ersten Zeile entspricht dem Nullwert und zeigt CIK-Zellen nach Kokultivierung mit CAP-1 gepulsten dendritischen Zellen. Bestimmt wurde die Expression des T-Zellrezeptors für ein irrelevantes Peptid (hier PepCD19). Im linken Bild der zweiten Zeile werden CIK-Zellen nach Kokultur mit CEA-Protein gepulsten DC gezeigt, bestimmt wurde der Anteil spezifischer CAP-1 T-Zellrezeptoren. Das rechte Bild in der zweiten Zeile zeigt CAP-1 spezifische T-Zellrezeptoren auf CIK-Zellen nach Kokultur mit CEA-Peptid (CAP-1) gepulsten dendritischen Zellen.

In der graphischen Darstellung der Lichtstreuung des Vorwärts und des Seitwärtslaser ließ sich die Lymphozytenpopulation gut abgrenzen (1. Bild links oben, Gate A). Diese wurde bezüglich ihrer CD8 Expression und der Expression des spezifischen T-Zellrezeptors untersucht. In der Lymphozytenpopulation waren die zytotoxischen Zellen gut als eigenständige Population zu erkennen (B2 und B4). Zellen auf denen gebundenes Dimer detektiert wurde lagen in den Bereichen B1 und B2. Doppelt positive Zellen liegen im Quadranten B2 und sind rot hervorgehoben. Auch hier ließen sich die Populationen abgrenzen.

Tabelle 4: Anteil der CIK-Zellen mit peptidspezifischen T-Zellrezeptor an der Lymphozytensubpopulation nach Cokultur mit gepulsten dendritischen Zellen. Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Expression nach Subtraktion der Kontrollmessung. Die Daten zeigen die Mittelwerte von zwei voneinander unabhängigen Messungen.

Dimer beladen mit	DC gepulst mit	Peptidspezifischer T-Zellrezeptor ⁺ und CD8 ⁺	Peptidspezifischer T-Zellrezeptor ⁺	Anteil doppelpositiver Zellen von CD8 ⁺ Zellen
PepCD19	CAP-1	0,29%	0,55%	0,90%
CAP-1	CEA-Protein	1,15% (0,86%)	1,45% (0,90%)	2,76% (1,86%)
CAP-1	CAP-1	1,62% (1,33%)	2,00% (1,45%)	3,72% (2,82%)

In der Kontrollmessung wurde mit irrelevantem Peptid beladenes Dimer zu CIK-Zellen gegeben, die mit CAP-1 gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden waren. Es konnte ein Anteil von 0,29% Zellen detektiert werden, die doppelpositiv waren, d.h. sowohl das Differenzierungscluster CD8 wie auch den T-Zellrezeptor für das Peptid, hier PepCD19, exprimierten. Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen 0,29% um unspezifische Bindungen handelt, da physiologischerweise keine T-Zellrezeptoren gegen das CD19-Peptid ausgebildet werden und das Pulsen der dendritischen Zellen mit CAP-1 auch keine T-Zellantwort gegen CD19 induziert. Die Messungen in denen mit irrelevantem Peptid beladenes Dimer eingesetzt worden ist, wurden deswegen als Artefakte interpretiert.

Nach Cokultur mit CEA-Protein gepulsten DC exprimierten 1,15% der CIK-Zellen sowohl den CAP-1 spezifischen T-Zellrezeptor, als auch CD8. Dies entspricht einem Anstieg um 0,86 Punkte im Vergleich zur Kontrollmessung. Wurden die DC mit CAP-1 gepulst, konnte sogar eine Zunahme der doppelpositiven Zellen um 1,33 Punkte auf 1,62% beobachtet werden.

Da nicht nur zytotoxische T-Zellen über Rezeptoren zur Antigenerkennung an MHC-Komplexen verfügen, wurde auch der Anteil der rezeptorspezifischen Lymphozyten unabhängig von ihrem CD8 Status untersucht. Hier bot sich ein ähnliches Bild. Die Kontrollgruppe exprimierte zu 0,55% den Rezeptor. Bei mit CEA Protein gepulsten DC kokultivierten CIK-Zellen stieg der Anteil auf 1,45% und lag nach dem Pulsen mit CAP-1 bei 2,0%. Nach Proteinzugabe konnten demnach 0,9% rezeptorspezifische Zellen und nach Pulsen mit Peptid ein Anteil von 1,45% Zellen mit dem Merkmal ermittelt werden.

Von Interesse ist der prozentuale Anteil an antigenspezifischen zytotoxischen Zellen an der CD8⁺ Population. Bei der Untersuchung der doppelpositiven Zellen als Subpopulation der zytotoxischen Zellen ergab sich wiederum ein um den Faktor 1,5 höherer Anteil spezifischer CD8⁺ Zellen nach Cokultur mit Peptid gepulsten DC im Vergleich zu CIK-Zellen, die mit Protein gepulsten DC kokultiviert worden waren. Abzüglich des Kontrollwertes exprimierten 1,86% der CD8⁺ Zellen einen T-Zellrezeptor, der CAP-1 erkennt, nachdem sie mit dendritischen Zellen kokultiviert worden sind, die mit Protein gepulst worden sind. Durch Beladen der dendritischen Zellen mit Peptid, anstelle des Pulsens mit Protein konnte der Anteil auf 2,82% erhöht werden. Native CIK-Zellen exprimierten zu <0,1% den untersuchten T-Zellrezeptor.

4.5.4 Nachweis IFN- γ produzierender CIK-Zellen mittels der ELISpot-Technik

In ELISpot Versuchen wurde die Interferon-gamma Produktion von CIK-Zellen als Parameter ihrer Aktivierung bestimmt. CIK-Zellen wurden in Zellzahlen zwischen 10^4 und 5×10^4 48 Stunden auf Antikörper beschichteten Nitrozellulose-Platten inkubiert. Es wurden native CIK-Zellen, CIK-Zellen die mit ungepulsten und gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden waren und kokultivierte CIK-Zellen, die zusätzlich mit Tumorzellen kokultiviert worden waren, eingesetzt. Tumorzellen wurden 24 Stunden vor dem Ansetzen des ELISpots in einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 zu den kokultivierten CIK-Zellen gegeben. Nach 24 Stunden waren mikroskopisch keine Colo

205 Zellen mehr zu entdecken.

Tabelle 5: Nachweis IFN- γ produzierender CIK-Zellen im ELISpot

	Spot-Anzahl/ 10^4 Zellen
CIK-Zellen	$3 \pm 0,2\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit DC	$45 \pm 12\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit Myoglobin gepulsten DC	$47 \pm 10\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit CEA gepulsten DC	$57 \pm 10\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit DC und Colo 205-Zellen	$128 \pm 12\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit Myoglobin gepulsten DC und Colo 205-Zellen	$96 \pm 34\%$
CIK-Zellen kokultiviert mit CEA gepulsten DC und Colo 205-Zellen	$99 \pm 31\%$

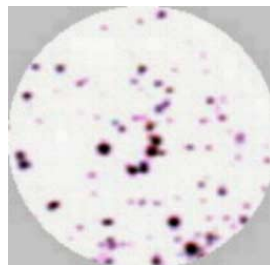


Abbildung 19: Nitrozellulosemembran mit IFN- γ Spots

Bei nativen CIK-Zellen konnten, trotz einer Stimulation mit Phytohämagglutinin, nur wenige IFN- γ produzierende Zellen nachgewiesen werden (3 von 10^4 Zellen). Eine Kokultivierung mit dendritischen Zellen steigerte die Anzahl zytokinproduzierender CIK-Zellen stark, wobei ein Pulsen der DC nur geringfügige weitere Steigerungen nach sich zog. Eine Zunahme der Spot-Anzahl um mehr als den Faktor zwei konnte durch die zusätzliche Kokultur mit Tumorzellen erreicht werden. Bei diesen zweifach kokultivierten CIK-Zellen konnte die stärkste Zytokinproduktion nach Kokultur mit ungepulsten DC beobachtet werden (128 Spots/ 10^4 Zellen). CIK-Zellen, die mit Myoglobin oder CEA gepulsten DC und Colo 205-Zellen kokultiviert worden waren, bildeten gleich viele Spots (96 versus 99 Spots/ 10^4 Zellen). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.6 Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen

Ein spezifisches Pulsen von dendritischen Zellen mit definierten Tumorantigenen scheitert oftmals daran, daß nur für wenige Tumore tumor-assoziierte Antigene beschrieben sind. Um zytotoxische Zellen zu rekrutieren, die *in vivo* durch ein fehlendes Signal seitens der antigenpräsentierenden Zellen anerg sind, wurden Möglichkeiten der unspezifischen Stimulation mit modifizierten APC untersucht. Es wurde versucht durch eine Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen eine Hochregulierung von MHC Klasse II-Molekülen zu bewirken. Durch eine verstärkte Stimulation von T-Helferzellen sollte eine Erhöhung der Zytotoxizität mit DC kokultivierter CIK-Zellen erreicht werden. Die Bedeutung der T-Helferzellen konnte unter 4.5.2 aufgezeigt werden.

4.6.1 Integrinexpression auf dendritischen Zellen

Der adenovirale Gentransfer wird initiiert durch die Anbindung des Virus mit seinem Fiberprotein am Cocksackievirusrezeptor (CA-Rezeptor). Der eigentliche Viruseintritt in die Zellen wird über die Bindung viraler Pentonbasisproteinen an die zellulären Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt.

Durchflußzytometrisch wurde die Expression von CAR und Integrinen auf dendritischen Zellen in Abhängigkeit von ihrer Reife bestimmt.

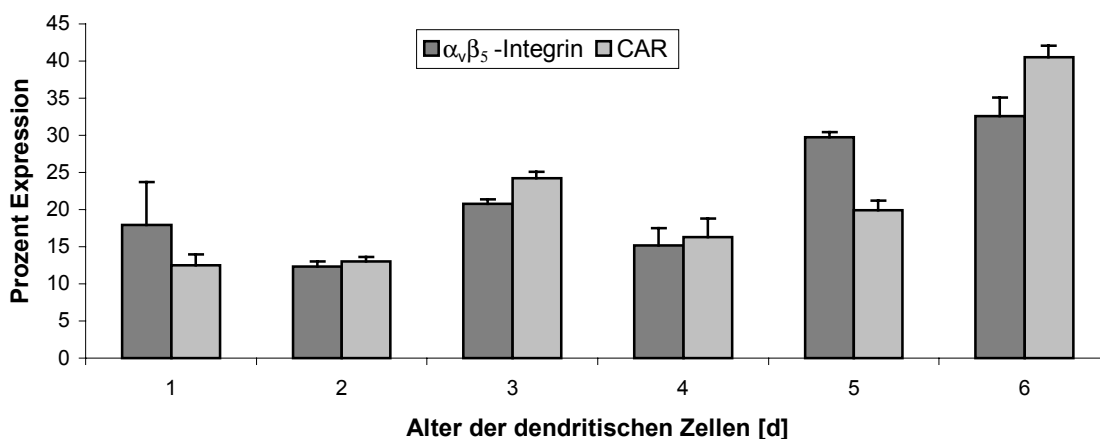


Abbildung 20: Expression von Integrin und CAR auf dendritischen Zellen in Abhängigkeit vom Alter der DC

Dendritische Zellen exprimieren die für den adenoviralen Gentransfer erforderliche Oberflächenmerkmale. Die Expression von CAR und $\alpha_v\beta_5$ nimmt mit zunehmendem Alter der Zellen zu. Am ersten Tag der Kultivierung liegt die Expression von CAR bei 12,5% und bei 17,9% für $\alpha_v\beta_5$. Am Tag +6 exprimieren 40,6% der DC den CA-Rezeptor und 32,6% das Integrin $\alpha_v\beta_5$. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Messungen.

4.6.2 Effizienz der Transfektion dendritischer Zellen mit Poly-L-Lysin (AdV-PLL) gekoppeltem Adenovirus

Nachdem gezeigt werden konnte, daß dendritische Zellen über die notwendigen Rezeptoren für einen adenoviralen Gentransfer verfügen, wurde untersucht, ob sich dendritische Zellen mit AdV-PLL transfizieren lassen. Als Reportergen wurde *lacZ* verwendet, so daß transfizierte Zellen sich nach Zugabe von X-gal aufgrund ihrer blauen Anfärbung gut bestimmen ließen. Um abzuklären, ob die Transfektionseffizienz abhängig vom Alter der dendritischen Zellen ist, wurden die Zellen von Tag +1 bis Tag +6 transfiziert. Ein Gentransfer zu einem späterem Zeitpunkt wäre im gewählten Modell nicht optimal da das Virus zwei Tage auf den DC verbleibt und die Kokultur der CIK-Zellen

an Tag +7 stattfindet. Eine Transfektion zu einem späterem Zeitpunkt würde also auch die CIK-Zellen in Kontakt mit dem AdV-PLL bringen.

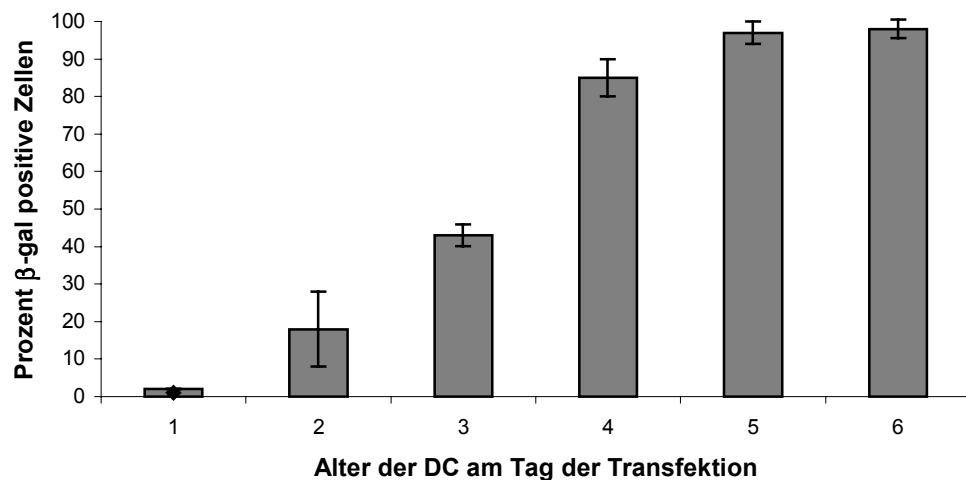


Abbildung 21: Effizienz der adenoviralen Transfektion dendritischer Zellen. Mit dem *lacZ*-Gen transfizierte Zellen wurden durch Blaufärbung nach X-gal Zugabe detektiert

Die Transfektion dendritischer Zellen mittels AdV-PLL konnte in Abhängigkeit vom Alter der Zellen erfolgreich durchgeführt werden. Die Effizienz stieg von 2% an Tag +1 auf nahezu 100 % an Tag +5. Es wurden keine zytopathischen Effekte beobachtet. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

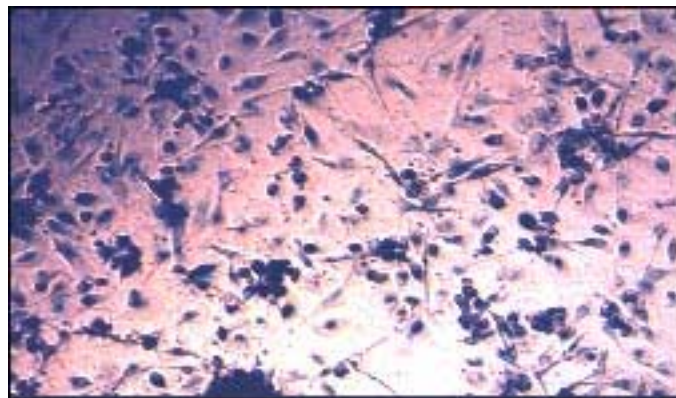


Abbildung 22: Fünf Tage alte dendritische Zellen nach Transfektion mit dem *lacZ*-Gen und Anfärbung positiver Zellen durch Zugabe von X-gal (fotografiert bei 100 \times Vergrößerung)

4.6.3 Nachweis von CIITA-RNA mittels RT-PCR

Nachdem gezeigt werden konnte, daß dendritische Zellen mit AdV-PLL transfiziert werden können, wurden DC mit dem CIITA-Gen transfiziert. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem *lacZ*-Gen ‚mock‘ transfiziert. Anschließend wurde aus den transfizierten DC die RNA isoliert. Isolierte RNA wurde mittels RT-PCR mit spezifischen Primern für CIITA in cDNA umgeschrieben. Die amplifizierte DNA wurde gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen wurde eine Wasserprobe mitgeführt, und das ubiquitär vorkommende β -Aktin Gen nachgewiesen.

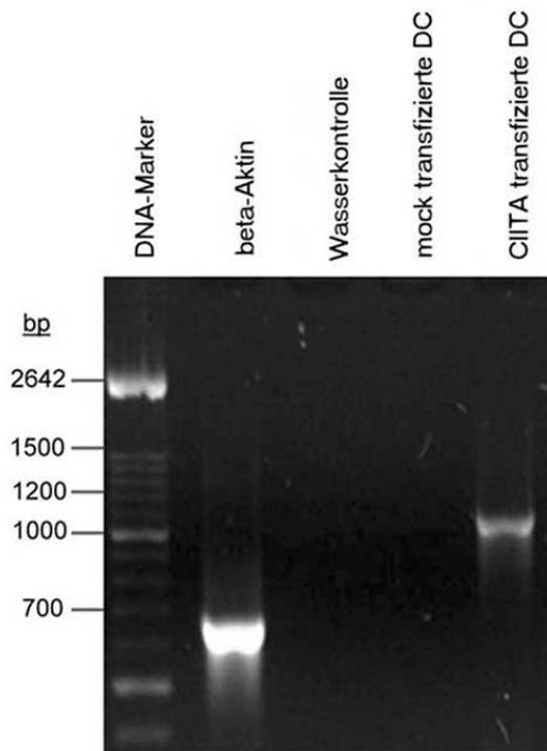


Abbildung 23: Agarosegel nach RT-PCR zum Nachweis von CIITA-RNA in CIITA-transfizierten DC (Transfektion an Tag +5)

Aus transfizierten dendritischen Zellen konnte erfolgreich RNA isoliert werden. Nach Umschreibung der RNA in cDNA und Amplifikation mittels PCR-Technik, konnte in der gel-elektrophoretischen Auftrennung eine Bande in Höhe der erwarteten 1079 Basenpaare sichtbar gemacht werden. In dendritischen Zellen, die mit einem irrelevanten Gen transfiziert wurden, konnte keine CIITA-RNA nachgewiesen werden. Bei sehr jung transfizierten DC (≤ 2 Tage) konnte keine CIITA-RNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.4 Expression von MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen nach Transfektion mit dem CIITA-Gen

Dendritische Zellen wurden an Tag +3 mittels AdV-PLL mit dem Gen für CIITA transfiziert. Durchflußzytometrisch wurde die Expression von MHC Klasse I und MHC Klasse II-Molekülen bestimmt. Zur Kontrolle wurden dendritische Zellen mit einem mock-Gen (dem *lacZ*-Gen) ebenfalls mit AdV-PLL transfiziert.

Tabelle 6: Expressionsmuster von MHC-Molekülen auf CIITA transfizierten dendritischen Zellen

Tag der Kultivierung	Expression von HLA-ABC nach mock Transfektion	Expression von HLA-ABC nach Transfektion mit dem CIITA Gen	Expression von HLA-DR nach mock Transfektion	Expression von HLA-DR nach Transfektion mit dem CIITA Gen
+3	75,0 ± 10,3%	73,6 ± 13,4%	25,1 ± 0,4%	50,3 ± 17,5%
+4	66,0 ± 0,2%	57,7 ± 9,5%	25,8 ± 1,0%	41,0 ± 7,6%
+5	57,1 ± 1,8%	76,9 ± 7,3%	26,9 ± 3,1%	74,8 ± 4,4%
+7	74,5 ± 2,9%	73,4 ± 2,2%	49,5 ± 2,9%	46,6 ± 0,9%
+9	84,5 ± 3,5%	95,9 ± 1,3%	55,4 ± 3,1%	82,6 ± 1,8%
+12	87,9 ± 1,9%	82,5 ± 12,9%	65,8 ± 2,1%	70,5 ± 10,1%

Das Expressionsmuster von HLA-ABC Molekülen auf dendritischen Zellen nach Transfektion mit dem CIITA Gen bot kein einheitliches Muster. Die Expression änderte sich jedoch nicht wesentlich und wurde durch die Transfektion meistens leicht erhöht. An Tag +4 kam es zu einer auffällig verminderten Expression, an Tag +5 konnten wesentlich mehr HLA-ABC positive Zellen detektiert werden.

Die Expression des Oberflächenantigens HLA-DR stieg bei dendritischen Zellen im Verlauf der Kultivierung stetig an. Nach der Transfektion mit dem CIITA Gen kam es zusätzlich zu einem statistisch signifikanten ($p = 0,046$) Anstieg der HLA-DR Expression, der lediglich an Tag +7 sogar leicht unter den prozentualen Anteil der MHC Klasse II-Molekülexpression bei mock transfizierten Zellen fiel. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

4.6.5 Zytotoxizität von CIK-Zellen nach Cokultivierung mit CIITA-transfizierten dendritischen Zellen

Hintergrund für den adenoviralen Gentransfer des CIITA-Genes in dendritische Zellen war die Vermutung, durch eine verstärkte Expression von MHC Klasse II-Molekülen eine Aktivierung von T-Helferzellen zu bewirken, die wiederum eine gesteigerte Zytotoxizität der CD8⁺ Zellen induzieren sollten. Untersucht wurde dies im LDH-Freisetzungstest mit der CA 19-9 exprimierenden Zelllinie DAN-G als Target. Dendritische Zellen wurden ungepulst, bzw. mit 50 U/ml CA 19-9 ab Tag +1 über zwei Tage gepulst, eingesetzt. Die Transfektion des CIITA-Genes, bzw. des mock-Genes (hier das *lacZ*-Gen) in die dendritischen Zellen wurde am Tag +3 vorgenommen.

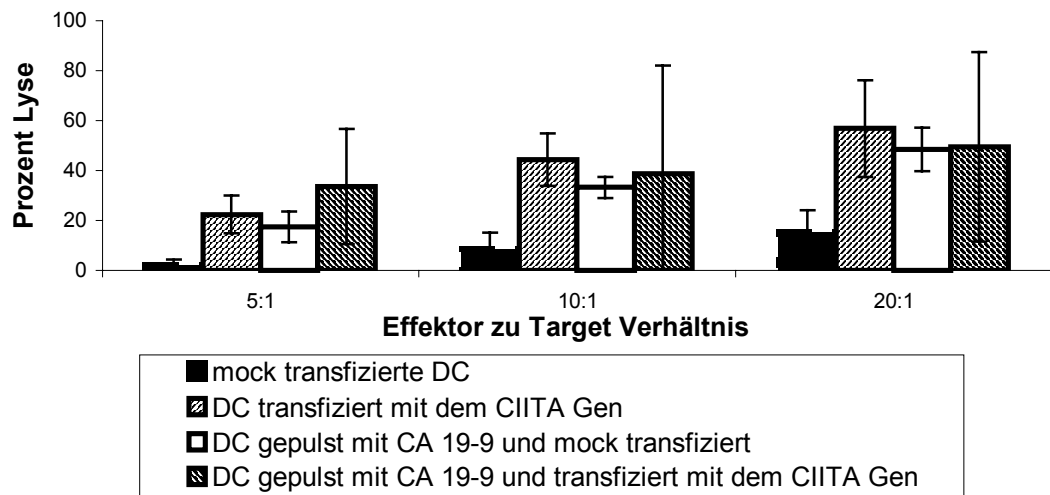


Abbildung 24: Zytotoxische Wirkung von CIK-Zellen gegen Pankreaskarzinomzellen nach Cokultur mit CA 19-9 gepulsten und mit dem CIITA-Gen transfizierten dendritischen Zellen

Effektorzellen, die mit dendritischen Zellen kokultiviert worden sind, zeigten eine zytotoxische Wirkung gegen Pankreaskarzinomzellen. Dieser Effekt konnte durch das Pulsen mit CA 19-9 bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 20:1 von $15,3 \pm 8,9\%$ auf $48,5 \pm 8,8\%$ gesteigert werden. Eine Transfektion der gepulsten dendritischen Zellen mit dem CIITA-Gen bewirkte keine weitere signifikante Steigerung. Hingegen ist beim Vergleich ungepulster dendritischer Zellen mit ungepulsten, transfizierten Zellen, eine stark zytotoxizitätssteigernde Wirkung der Transfektion zu verzeichnen (15,3% versus 56,8%). Bei der Gegenüberstellung des Effektes ungepulster, transfizierter Zellen mit dem gepulster, transfizierter DC, läßt sich wegen der großen Standardabweichung keine eindeutige Aussage treffen ($56,8 \pm 19,3\%$ vs. $49,6 \pm 37,9\%$). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier voneinander unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

Die hohe Rezidivrate bei Patienten mit gastroenteropankreatischen Tumoren reflektiert den Nutzen von neuen therapeutischen Strategien. Als solche Strategien böten sich immunologische Therapieformen an. Patienten mit minimaler Tumorerkrankung würden von immunologischen Therapieformen besonders profitieren, da diese Therapieformen wahrscheinlich ihre höchste Effektivität bei geringer Tumorlast haben. Untersuchungen, in denen immunologische Effektorzellen, wie TILs (Rosenberg et al., 1986), LAK-Zellen (Grimm et al., 1982) oder CIK-Zellen (Schmidt-Wolf et al., 1994), eingesetzt wurden, zeigten eine relative Resistenz von soliden Tumoren gegen immuntherapeutische Ansätze (Bean and Mazumder, 1992). Um zytotoxische tumorspezifische T-Zellen zu rekrutieren, ist die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen in Verbindung mit MHC-Molekülen auf dendritischen Zellen notwendig. Tumore können durch die Sekretion von Interleukin-10 oder *vascular endothelial growth factor* die Funktion und die Reifung von dendritischen Zellen hemmen (Schuler and Steinman, 1997; Gabrilovich et al., 1998). Mittlerweile ist es möglich, dendritische Zellen in größeren Mengen *ex vivo* zu generieren (Inaba et al., 1992; Romani et al., 1994; Caux et al. 1996), sie mit Tumorantigenen zu beladen und sie dann als Vakzine bei Tumorkranken zu verwenden.

5.1 Etablierung des Modells

Es sollte ein System etabliert werden, in dem bei CIK-Zellen durch eine Kokultivierung mit gepulsten dendritischen Zellen zytotoxische Wirkung gegen gastroenteropankreatische Tumorzellen induziert wird. $1 - 3 \times 10^6$ dendritische Zellen mit der typischen Morphologie (Abbildung 3) konnten erfolgreich aus 100 ml peripherem Blut durch Zugabe von Interleukin-4 und GM-CSF generiert werden. Diese Ausbeute liegt in der von Romani beschriebenen Größenordnung (Romani et al., 1994). Die Zellen konnten, um eine Stimulation durch in fetalem Kälberserum enthaltene Antigene zu vermeiden, problemfrei in autologem Serum kultiviert werden. Aus der nicht adhären Phase isolierter mononukleärer Zellen konnten erfolgreich durch Zytokinstimulation CIK-Zellen gewonnen werden, die am siebenten Tag der Kultivierung mit autologen dendritischen Zellen über weitere sieben Tage kokultiviert wurden. Der Zeitpunkt erwies sich als günstig, da dendritische Zellen am Tag +7 der Kultivierung bereits hohe Spiegel an T-zellstimulierenden Oberflächenmarkern exprimieren und keiner weiteren Zytokinstimulation bedürfen. CIK-Zellen sind nach 10-14tägiger Kultur hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaft ausgereift. Die gewählte Kokultivierungsdauer liegt in dem in der Literatur beschriebenen Bereich. Boczkowski et al. kokultivieren zytotoxische T-Zellen fünf Tage mit DC (Boczkowski et al., 1996), Diao et al. lassen die T-Zellen sieben Tage in Kokultur (Diao et al., 1999) und Philip et al. belassen die Zellen zehn bis zwölf Tage zusammen (Philip et al., 1997). Bei der Kokultur wurde ein Stimulator zu Responder Verhältnisse von 1:2 bis 1:6 erreicht. Dendritische Zellen sind in der Lage, weit mehr T-Zellen zu aktivieren. Ein Stimulator zu Responder Verhältnis von 1:100-3.000 ist beschrieben (Bancherou and Steinman, 1998), doch war das gewählte autologe System aufgrund der verfügbaren Zellzahlen limitiert.

Die DC wurden durchflußzytometrisch untersucht (Tabelle 1). Dendritische Zellen ließen sich durch das parallele Vorliegen unterschiedlicher Reifegrade in der durchflußzytometrischen Darstellung nur schwer als eigenständige Population definieren, konnten aber sicher von CD14⁺ Monozyten getrennt werden. In der Literatur sind, allein schon bedingt durch die unterschiedlichen Generierungsmethoden, verschiedene Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenmarker beschrieben. Grundsätzlich werden aber mäßig bis sehr hohe Expressionen von CD1a, CD80, CD83, CD86, CMRF-44 und MHC-Molekülen beschrieben. Die beobachteten Expressionsprofile konvergieren mit diesen Literaturdaten (Hart, 1997; Bancherou and Steinman, 1998; Romani et al., 1994; Steinman, 1991). Allerdings exprimierten lediglich $54,5 \pm 3,0\%$ der generierten DC den als typisch für dendritische Zellen beschriebenen Marker CMRF-44. Da aber alle untersuchten Zellen eine für dendritische Zellen typische Morphologie aufwiesen, ist die mäßige Expression möglicherweise durch Probleme bei der Färbung mittels Zweitantikörpers bedingt (gebundener mAK CMRF-44 mußte durch einen sekundären Antikörper gegen IgM detektiert werden). Die im

Verlauf der Kultivierung beobachtete Zunahme der Expression obengenannter Marker erklärt sich durch die Reifung zu maturen dendritischen Zellen. Es wurden durchflußzytometrische Daten von stimulierten und mit CIK-Zellen kokultivierten DC gewonnen. Interessanterweise bewirkte ein Pulsen der dendritischen Zellen mit Antigen (Myoglobin aus Rinderherz) eine Zunahme der Expression an untersuchten Markern. Dies spiegelt möglicherweise die Vorgänge bei der Aktivierung von dendritischen Zellen nach Antigenkontakt *in vivo* wider. Eine weitere Zunahme der Oberflächenantigene durch die Kokultivierung von CIK-Zellen zeigt, daß die Interaktion von DC mit T-Zellen sich nicht nur auf die T-Zellen, sondern auch auf die dendritischen Zellen auswirkt. Ridge et al. schlägt ein dynamisches Modell vor, in dem T-Helferzellen APCs derart stimulieren, daß sie in der Lage sind, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (Ridge et al., 1998).

5.2 Gepulste dendritische Zellen zur Steigerung der Zytotoxizität immunologischer Effektorzellen

In LDH-Freisetzungstests erwiesen sich CIK-Zellen als nur sehr schwach lytisch gegen die eingesetzten pankreatischen und kolorektalen Zelllinien. Die Kokultivierung der Effektorzellen mit dendritischen Zellen bewirkte eine starke Zunahme der Zytotoxizität (4.2). Es ist zu vermuten, daß costimulatorische Moleküle, wie der Kontakt von CD28 auf den T-Zellen mit den von dendritischen Zellen exprimierten CD80 und CD86 Molekülen die T-Zellaktivierung bewirkten. Des weiteren sezernieren dendritische Zellen Interleukin-12, welches die Zytotoxizität von CIK-Zellen erhöht (Zoll et al., 1998). Wurden die dendritischen Zellen mit Antigen gepulst, das von den Targetzellen nicht exprimiert wird, wurden sie also unspezifisch z.B. mit Myoglobin gepulst, induzierten sie eine noch stärkere Lyse. Wie unter 5.1 diskutiert, exprimieren dendritische Zellen nach Antigenstimulation in höherem Maße Oberflächenmarker, die für eine T-Zellaktivierung notwendig sind. Vor diesem Hintergrund ließen sich die verstärkte Zellyse durch eine erhöhte unspezifische T-Zellaktivierung erklären.

5.2.1 Pulsen dendritischer Zellen mit CA 19-9

Ziel war es, kokultivierte CIK-Zellen spezifisch zu aktivieren. Hierzu wurden dendritische Zellen mit CA 19-9 gepulst. Es erwiesen sich sehr niedrige Antigenkonzentrationen als effektiv, dies korreliert mit Angaben, die pico- nanomolare Konzentrationen an Antigen als ausreichend für eine Stimulation beschreiben (Sallusto and Lanzavecchia, 1994b). Höhere Konzentrationen an CA 19-9 verminderten die Lyse. Möglicherweise war dem Antigen als antimikrobielles Agens zugegebenes Natriumazid verantwortlich dafür. Eine durch überhöhte Antigenexposition induzierte Anergie ist allerdings nicht auszuschließen. Entscheidend für ein erfolgreiches Pulsen war der Zeitpunkt der Antigenzugabe. Bei der Verwendung von Proteinen zum Pulsen erwies sich eine frühe Zugabe (Tag +1) als optimal (Inaba et al., 1990). Dies erscheint plausibel, da immature DC über Rezeptoren für die Antigenaufnahme verfügen, die während des Reifeprozesses herunterreguliert werden. Dendritische Zellen sind im Vergleich zu Makrophagen nur schwach endozytotisch aktiv, aber präsentieren in hohem Maße Antigene. Dies läßt vermuten, daß Makrophagen Antigene endozytotisch degradieren und abbauen, der endozytotische Apparat der DC hingegen für eine Antigenpräsentation ausgebildet ist (Steinman and Cohn, 1972). Das Pulsen dendritischer Zellen mit CA 19-9 vermittelte kokultivierten CIK-Zellen eine zytotoxische Wirkung gegen CA 19-9 exprimierende Zelllinien, die deutlich über der zytotoxischen Wirkung lag, die allein durch unspezifische Aktivierung vermittelt wurde. Bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 40:1 konnten 86,2% der eingesetzten DAN-G Zellen lysiert werden (Abbildung 5). Peiper et al. verwendeten zum Pulsen dendritischer Zellen ein Peptid von der transmembranen Region des Protoonkogen *HER2/neu* als tumor-assoziiertes Antigen beim Pankreaskarzinom (Peiper et al., 1997). Sie erreichten damit aber bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 40:1 lediglich eine Lyse von 35-40%. In Blockadeexperimenten konnte gezeigt werden, daß es durch die Kokultur von CIK-Zellen mit CA 19-9 gepulsten dendritischen Zellen zu einer spezifischen Targetzellyse kommt. Wurde auf den Targetzellen das Tumorantigen CA 19-9 durch die Zugabe monoklonalen Antikörpers der Zellerkennung entzogen, waren die Effektorzellen nur noch in der Lage, die unspezifisch vermittelte Zytotoxizität zu bewirken (Abbildung 9).

5.2.2 Pulsen von dendritischen Zellen mit CEA-Protein und CAP-1

Versuche mit CEA-Peptid gepulsten dendritischen Zellen sind von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt worden. Alters et al. pulsten mit Interleukin-7 stimulierte DC nach der Entfernung gebundener Peptide auf den MHC-Molekülen der dendritischen Zellen mit dem CEA-Peptid CAP-1 in einer Konzentration von 40 mg/ml. Sie erreichen damit im Zytotoxizitätstest gegen kolorektale Zelllinien eine Lyse von ca. 15% bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 25:1 (Alters et al., 1997; Alters et al., 1998). Wong et al. beschreiben einen Ansatz mit CAP-1 gepulsten und mit Antisense-Oligonukleotiden gegen das *Transporters associated with Antigen Processing-2* Gen (TAP-2 Gen) behandelten dendritischen Zellen (Wong et al., 1997). Als Targetzellen wurden Zellen mit defektem TAP-Gen verwendet, durch die Funktionsstörung bedingt können bei diesen Zellen keine endogen gebundenen Peptide an MHC Klasse I-Moleküle präsentiert werden. Die auf der Zelloberfläche exprimierten leeren MHC Klasse I-Moleküle wurden, wie bei den eingesetzten DC, mit CAP-1 beladen. Nach einem Pulsen mit 25-50 µg/ml Peptid konnte im Zytotoxizitätstest bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 25:1 eine Lyse von ca. 38% beobachtet werden.

In dem hier untersuchten Ansatz wurden dendritische Zellen mit 1 µg/ml CAP-1 an Tag +7 beladen, die kokultivierten CIK-Zellen riefen im LDH-Freisetzungstest gegen CEA-exprimierende Kolonkarzinomzellen, bei ebenfalls 25fachem Effektorüberschuß, eine Zellyse von 67,9% hervor (Abbildung 7). Die starken Unterschiede in der vermittelten Zytotoxizität können durch die eingesetzten zytotoxischen Zellen erklärt werden. Alters et al. verwenden T-Zellen, Wong et al. setzen CD8⁺ angereicherte, Interleukin-2 stimulierte T-Zellen ein. Neben einer generell höheren zytolytischen Fähigkeit von CIK-Zellen, könnte die geringere Zytotoxizität bei Wong et al. auch durch das Fehlen von CD4⁺ T-Helferzellen nach einer CD8⁺ Anreicherung erklärt werden.

Analog zum Vorgehen bei der Verwendung von CA 19-9 wurde auch CEA-Protein eingesetzt. Das Pulsen an Tag +1 mit 100 ng/ml Protein bewirkte eine identische Zellyse, wie das Beladen mit CAP-1 an Tag +7 (Abbildung 7). Das Pulsen dendritischer Zellen mit Peptid wurde an späten Kulturtagen durchgeführt, da Peptide nicht über die früh exprimierten Antigenrezeptoren aufgenommen werden muß, sondern extrazellulär an MHC Klasse I-Moleküle bindet. Um zu untersuchen, ob das Pulsen mit CEA eine spezifische Zytotoxizität vermittelt, wurde im LDH-Freisetzungstest die CEA-negative Nierenzelllinie 293 eingesetzt. Die Zelllinie erwies sich als sensibel gegen kokultivierte CIK-Zellen, ein Pulsen mit Tumorentigen brachte aber keine Steigerung der Zellyse (Abbildung 8). Auch hier konnte wieder eine starke Aktivierung der Effektorzellen durch eine Kokultivierung mit unspezifisch gepulsten dendritischen Zellen beobachtet werden.

5.2.3 Kultivierung dendritischer Zellen mit tumormarkerhaltigem Serum von Patienten mit Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems

Um sich von den wenigen beschriebenen Tumorentigenen unabhängig zu machen, wurde untersucht, ob im Serum von Tumorpatienten antigene Substanzen enthalten sind, die zur Stimulation dendritischer Zellen genutzt werden können. Auch wurden bei der Verwendung exogenen Tumormarkers bei höheren Konzentrationen zytopathische Effekte beobachtet, die möglicherweise durch Konservierungsstoffe hervorgerufen wurden.

Die Kultivierung dendritischer Zellen in tumormarkerhaltigem Serum (CA 19-9 und CEA) bewirkte eine erhöhte Zytotoxizität kokultivierter CIK-Zellen gegen tumormarkerexprimierende Targetzellen (4.3.1). Dieser Effekt zeigte sich unabhängig davon, ob allogene oder autologe Seren eingesetzt wurden. Eine antigene Wirkung allogener Seren konnte nicht gezeigt werden. Die induzierte Zytotoxizitätssteigerung konnte durch Steigerung des prozentualen Anteils an tumormarkerhaltigem Serum im Kultivierungsmedium erhöht werden (Abbildung 11). Um die Hypothese zu festigen, daß die beobachteten Effekte durch den Gehalt an Tumormarker im Serum bewirkt wurden, wurden Seren von Karzinompatienten in einer Endkonzentration von 100 U/ml CA 19-9 im Kultivierungsmedium eingesetzt. Zum Vergleich wurden dendritische Zellen mit dem Serum eines gesunden Spender kultiviert und mit 100 U/ml exogenem CA 19-9 gepulst. Die im LDH-Freisetzungstest ermittelten Zellysen ergaben gleich hohe Zytolysen bei allen untersuchten Ansätzen, unabhängig davon, ob exogenes Protein oder im Serum unterschiedlicher Patienten enthaltenes CA 19-9 zum Pulsen eingesetzt worden war (Tabelle 3). Da der Serumspiegel der drei untersuchten Patienten unterschiedlich hoch war, ergaben sich unterschiedlich hohe prozentuale

Serumanteile, dies wirkte sich jedoch nicht aus.

Es ist in der Zellkultur üblich, Serum zur Komplementinaktivierung einer Hitzeinaktivierung zu unterwerfen. Die Hitzeinaktivierung tumormarkerhaltiger Seren brachte die zuvor beobachtete Steigerung der zytotoxischen Fähigkeit kokultivierter CIK-Zellen zum Verschwinden (4.3.3). Dies spricht dafür, daß die Steigerung durch einen hitzelabilen Stoff, wie einem Protein, hervorgerufen wurde. Bedauerlicherweise konnte sich eine Denaturierung von Tumormarker im Serum durch eine Hitzeinaktivierung nicht belegen, da die verwendete Detektionsmethode keinen Unterschied zwischen nativem und denaturierten Protein macht (3.2.3.6).

Da die Verwendung exogenen Proteins dosislimitiert ist und tumormarkerhaltiges Serum maximal 50% des Kulturmediums ausmachen kann, da sonst der Anteil an Nährstoffen zu gering wird, wurde untersucht, ob beide Formen des Pulsens miteinander kombiniert werden können. Dendritische Zellen, die in tumormarkerhaltigen Serum kultiviert und zusätzlich mit exogenem Tumormarker gepulst wurden, vermittelten den kokultivierten Effektorzellen eine weit höhere zytotoxische Wirkung, als nur einfach gepulste DC (4.3.5).

Die gemachten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß Tumormarker im Serum von Karzinompatienten *ex vivo* generierte dendritische Zellen spezifisch aktiviert.

5.2.4 Immunologische Zellen von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren

Es konnte gezeigt werden, daß die diskutierten Phänomene sich nicht nur mit Zellen von gesunden Probanden erreichen ließen, sondern auch mit immunologischen Zellen von Tumorpatienten (4.3.3). Die induzierten Zytotoxizitäten im Patientenmodell lagen nicht wesentlich unter den Werten, die Zellen gesunder Spender bewirkten. Dies ist in Anbetracht der bösartigen Grunderkrankung um so erstaunlicher.

Von großem Interesse war die Frage, ob CIK-Zellen in der Lage sind autologe Tumorzellen zu lysieren. Die Etablierung von Primärkulturen aus Tumormaterial erwies sich als durchführbar. Eine genauere Charakterisierung der Zellen bezüglich Tumormarkerexpression oder Färbung auf Zytokeratin war wegen der geringen Zellzahlen leider nicht möglich. Ausgehend von der Morphologie ist aber davon auszugehen, daß es sich bei den eingesetzten Zellen überwiegend um kolorektale Tumorzellen gehandelt hat.

Sowohl für Patienten mit CA 19-9 exprimierenden Tumoren, wie auch für Patienten mit erhöhtem CEA-Spiegel ließen sich autologe Modelle entwickeln. In beiden Ansätzen kam es nach Kultivierung der dendritischen Zellen in autologem unbehandeltem Serum zu einer zytotoxischen Wirkung kokultivierter CIK-Zellen. Das Pulsen der dendritischen Zellen mit exogenem Tumorantigen, bei Kultivierung in autologem hitzeinaktiviertem Serum vermittelte noch höhere Zytolysen. Dies ist in Anbetracht der niedrigen Tumormarkerspiegel der untersuchten Patienten nicht verwunderlich, beim Pulsen mit tumormarkerhaltigem Serum wurden deswegen suboptimale Dosierungen verwendet. Der stärkste Effekt konnte durch Kultivierung in unbehandeltem Serum und zusätzlichem Pulsen mit exogenem Tumormarker erreicht werden. Ein Pulsen mit CA 19-9 erbrachte bei den Zellen von Patienten, die keinen erhöhten CA 19-9 Serumspiegel aufwiesen, keine zytotoxizitätssteigernde Wirkung. Die gemessenen Zytotoxizitäten lagen mit 98,3% bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 80:1 für die Zellen von Patienten mit erhöhten CA 19-9 Serumspiegel (Abbildung 14), und mit 50% bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 16:1 für die Gruppe der CEA exprimierenden Tumore (Abbildung 15), erfreulich hoch und im Bereich der Zytolysen, die bei Verwendung von Zelllinien hervorgerufen wurden.

5.2.5 Zusammenfassung: Pulsen dendritischer Zellen

In der Literatur sind viele Möglichkeiten zum Pulsen von dendritischen Zellen beschrieben (1.1). Grundsätzlich kann zwischen dem Pulsen mit definiertem Tumorantigen und dem Pulsen mit unfractioniertem Tumorantigen unterschieden werden. Der Einsatz definierten Tumorantigens mündet in einer genau formulierten Vakzine, bei der die Induktion einer Autoimmunantwort nicht zu befürchten ist. Allerdings schränkt die Verwendung definierten Antigens immuntherapeutische Ansätze auf die Tumorentitäten ein, für die tumor-assoziierte Antigene beschrieben sind. Unfractionierte Tumorantigene, wie Tumorsat, Tumor-RNA oder -DNA reduzieren das Risiko, das der Tumor sich durch Mutation dem einzigen definierten Epitop entzieht, das zum Pulsen

verwendet wurde. Stark einschränkend wirken sich allerdings die Probleme bei der Gewinnung ausreichend großer Tumormengen aus, zumal bei der Patientengruppe, die von einer immunologisch gerichteten Therapie wahrscheinlich am meisten profitieren würde, nämlich der Patientengruppe mit einer nicht nachweisbaren oder nur minimal residualen Erkrankung.

Bei den hier untersuchten Tumorentitäten sind die tumor-assoziierten Antigene CA 19-9 und CEA beschrieben. Diese wurden in dieser Arbeit zum Pulsen dendritischer Zellen verwendet. Die Effekte bei Verwendung des kompletten Proteins bzw. eines definierten Epitops waren gleich stark ausgeprägt. Dem Pulsen mit Protein ist der Vorzug zu geben, da Gesamtprotein unabhängig vom HLA-Typ eingesetzt werden kann, leichter erhältlich ist und keine Voruntersuchungen zur Bestimmung der antigenen Determinante erfordert. Auch können sich definierte Epitope leichter dem immunologischen Angriff durch Mutation entziehen.

Erstmals beschrieben wurde hier der Einsatz von Serum von Tumorpatienten im Sinne eines Pulsens mit unfraktionierten Tumorantigenen. Die Verwendung autologer oder allogener unbehandelter Seren von Karzinompatienten zum Pulsen dendritischer Zellen ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, daß eine Kultivierung in tumormarkerhaltigem Serum eine Stimulation dendritischer Zellen bewirkt. Es ist zu hoffen, daß dieser Effekt auch für Seren von Patienten mit anderen Tumorformen gilt, für die noch keine Tumormarker beschrieben sind.

Für eine nahezu 100%ige Zellyse mußten im Zytotoxizitätstest Effektorzellen in einem Überschuß zwischen 20:1 – 80:1 eingesetzt werden, wobei sich Colo 205 Zellen dem immunologischen Angriff gegenüber sensibler zeigten als die Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G. Dieser benötigte Überschuß an Effektorzellen betont die Limitierung von derartigen immuntherapeutischen Strategien auf Patienten mit kleiner Tumormasse.

5.3 Veränderungen der Oberflächenmerkmale von CIK-Zellen durch die Cokultivierung mit dendritischen Zellen

CIK-Zellen zeigten nach Cokultur mit dendritischen Zellen ein verändertes Verhalten gegenüber gastrointestinalen Tumorzellen. Ferner ließ sich cokultivierten CIK-Zellen eine verstärkte Proliferation beobachten. Es konnte gezeigt werden, daß neben funktionellen Veränderungen auch phänotypisch Modifikationen zu beobachten waren.

5.3.1 Expression von T-Zellmarkern auf CIK-Zellen

Bei Untersuchungen der Oberflächenmerkmale cokultivierter CIK-Zellen wurde die Verteilung von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen ermittelt. Der Quotient von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen steigt bei nativen CIK-Zellen während der Kultivierung an und erreichte mit Tag +12 sein Maximum. Cokultivierte CIK-Zellen wiesen schon einen Tag nach Beginn der Cokultur 28% mehr zytotoxische T-Zellen als T-Helferzellen auf. Diese Verschiebung in Richtung CD8⁺ Zellen blieb an den folgenden Kultivierungstagen erhalten und lag ab Tag +9 im Mittel bei 50%, so daß an Tag +12 das Verhältnis von CD8⁺CD3⁺ zu CD4⁺CD3⁺ bei 1,8:1 lag (Abbildung 16). Während der siebentägigen Cokultur kam es zu einer starken Proliferation der Effektorzellen. Es ist anzunehmen, daß es durch die Präsentation von Antigenen auf MHC Klasse I-Molekülen auf den dendritischen Zellen, verbunden mit dem Vorliegen costimulatorischer Signale, zu einer klonalen Expansion von zytotoxischen T-Zellen kommt, deren Wirkung in den durchgeführten LDH-Freisetzungstests nachgewiesen werden konnte.

5.3.2 Bedeutung der T-Helferzellen bei der Cokultivierung von CIK-Zellen

Die Interaktion naiver T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen ist oftmals nicht ausreichend, um zytotoxische T-Zellen zu stimulieren. Die deswegen lange Zeit diskutierte Notwendigkeit, der gleichzeitigen Bindung antigenspezifischer T-Helferzellen und zytotoxischer T-Zellen an die APC wurde kürzlich in dieser Stringenz verworfen (Lanzavecchia, 1998). Das von P. Matzinger vorgeschlagene Modell läßt dendritische Zellen durch den Kontakt mit T-Helferzellen

konditionieren, die dann dahingehend differenzieren, daß sie in der Lage sind, zytotoxische T-Zellen direkt zu stimulieren (Ridge et al., 1998). Der Kontakt zwischen DC und T-Helferzellen findet über CD40/CD40L-Interaktionen statt. Neben dem Kontakt mit T-Helferzellen können auch andere Stimuli wie Viren, Lipopolysaccharide und TNF- α die Konditionierung der dendritischen Zellen bewirken. Damit lassen sich auch Beobachtungen, daß dendritische Zellen zytotoxische T-Zellen unmittelbar stimulieren können (Inaba et al., 1987), erklären.

Die Bedeutung von T-Helferzellen in dem hier untersuchten Modell konnte durch eine Blockade von MHC Klasse II-Molekülen auf den dendritischen Zellen gezeigt werden (4.5.2). Eine Blockade zu frühen Zeitpunkten verminderte die induzierte Zellyse, die Zugabe von Antikörper an späten Tagen bewirkte keine Veränderung. Zusammen mit der Beobachtung, daß eine Blockade der MHC Klasse I-Moleküle sich an späten Tagen schwerwiegender als wie eine Blockade an frühen Tagen auswirkte, ergibt sich ein Bild, das sich mit dem Modell von P. Matzinger vereinbaren läßt. T-Helferzellen binden zu Beginn der Kokultur an dendritische Zellen, dieser Stimulation der dendritischen Zellen folgt dann eine Interaktionen zwischen den MHC Klasse I-Moleküle auf den DC und den zytotoxischen Zellen. Wird der Kontakt von T-Helferzelle und dendritischer Zelle verhindert, werden zytotoxische Zellen weniger stark aktiviert. Die in 4.5.1 beobachtete Verschiebung kokultivierter CIK-Zellen in Richtung CD8⁺ T-Zellen bei zunehmender Kokultivierungsdauer läßt sich mit der Bedeutung von T-Helferzellen an frühen Tagen gut vereinbaren.

5.3.3 Spezifität von T-Zellrezeptoren

Zur Abklärung der Frage, inwieweit die Zunahme an zytotoxischen T-Zellen durch die Kokultivierung auch einen erhöhten Anteil antigenspezifischer T-Zellen bedeutet, wurden T-Zellrezeptoruntersuchungen durchgeführt. Alters et al. konnten nach einer Kokultivierung von T-Zellen mit CAP-1 beladenen DC eine oligoklonale Expansion beobachten (Alters et al., 1998). Sie untersuchten dabei die Expressionsmuster des Genes für den variablen Teil der β -Kette des T-Zellrezeptors. Die Tetramertechnik erlaubt es, gezielt spezifische T-Zellrezeptoren nachzuweisen, sie basiert auf dem gleichen Prinzip, wie die in dieser Arbeit verwendete Dimertechnik. Bei der Tetramertechnik wird ein biotinylierter HLA-A2/ β ₂-Mikroglobulin/Peptidkomplex mit Avidin-PE gekoppelt (Altman et al., 1996). Lee et al. untersuchten Blut von Melanompatienten mit Tetrameren auf die Expression von T-Zellrezeptoren für Melanom-assoziierte Antigene (MART, gp100 und Tyrosinase) und fanden, daß bis zu 2% der zytotoxischen Zellen spezifisch eines der Antigene erkennen (Lee et al., 1999). Diese T-Zellen waren aber anerg.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden T-Zellrezeptoren, die spezifisch CAP-1 erkennen mittels der Dimertechnik detektiert (4.5.3). Eine Kokultivierung der CIK-Zellen mit spezifisch gepulsten dendritischen Zellen bewirkte eine starke Zunahme der CAP-1 spezifischen zytotoxischen T-Zellen. 2,8% der CD8⁺ Zellen erkannten das Antigen, nachdem sie mit CAP-1 gepulsten DC kokultiviert worden waren. Für CIK-Zellen, die mit Gesamtprotein gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden waren, lag der Anteil bei 1,86%. Es ist davon auszugehen, daß dendritische Zellen, die mit Protein gepulst werden, eine Vielzahl von Epitopen präsentieren. Daher ist eine weniger starke Zunahme CAP-1 rezeptorspezifischer CD8⁺ Zellen durch die Kokultivierung mit Protein gepulster dendritischer Zellen, nicht verwunderlich. Es ist zu vermuten, daß der Anteil antigenspezifischer T-Zellen in beiden Fällen gleich hoch ist, jedoch nach dem Pulsen mit Peptid sich monoklonal darstellt, nach dem Pulsen mit Protein sich jedoch ein zumindest oligoklonales T-Zellrezeptorrepertoire ausbildet.

Irritierend ist der Umstand, daß bei der Detektion rezeptorspezifischer Zellen unabhängig von ihrem CD8 Status, keine relevante Zunahme im Vergleich zu den CD8⁺ rezeptorspezifischen Zellen beobachtet werden konnte. Der Anteil CD8⁻ rezeptorspezifischer Zellen lag lediglich um 5-9% über dem der CD8⁺ rezeptorspezifischer Zellen. Es scheinen sich also zumindest an Tag +14 der Kokultivierung nur noch wenige CD4⁺ Zellen, die das untersuchte Antigen erkennen können, in der Kultur zu befinden. Dies läßt sich nur teilweise durch die in 5.3.1 diskutierte prozentuale Abnahme von CD4⁺ Zellen im Vergleich zur CD8⁺ Population erklären.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten 2,8% peptidspezifischer zytotoxischer Zellen nach Kokultur mit gepulsten dendritischen Zellen liegen nicht wesentlich über den von Lee et al. im Blut von Melanompatienten erhobenen Befunde. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, daß die untersuchten CIK-Zellen zytotoxisch wirksam waren.

5.3.4 Interferon-gamma Produktion kokultivierter CIK-Zellen

Es wurde die Interferon-gamma Produktion von CIK-Zellen als Parameter ihre Stimulation bestimmt (4.5.4). CIK-Zellen sezernierten auch nach Stimulation mit polyklonalem Mitogen in nur geringem Maße IFN- γ . Eine Kokultivierung mit dendritischen Zellen bewirkte eine starke Stimulation der CIK-Zellen, wobei ein Pulsen der dendritischen Zellen nur eine geringfügig höhere IFN- γ Produktion bewirkte. Eine zweite Kokultivierung mit allogenen Tumorzellen stellte einen weiteren Stimulus für die CIK-Zellen dar. Nicht erklärbar ist der Umstand, daß die Kokultur mit ungepulsten DC und Tumorzellen einen stärkeren Reiz darstellte, als die Kokultur mit gepulsten dendritischen Zellen und Tumorzellen. Allerdings gab es bei diesen beiden Untersuchungen auch die statistisch größte Streuung der Einzeldaten.

5.3.5 Zusammenfassung: Veränderungen kokultivierter CIK-Zellen

Bei der Kokultivierung dendritischer Zellen mit CIK-Zellen kam es, bedingt durch die Zell-Interaktionen zu Veränderungen beider Zellpopulationen. Dendritische Zellen exprimierten nach Kontakt mit CIK-Zellen in verstärktem Maße antigenpräsentierende und costimulatorische Moleküle (Tabelle 1).

Bei den CIK-Zellen bewirkte die Kokultivierung mit dendritischen Zellen mehrere Veränderungen, die die erhöhte Zytotoxizität erklärbar machen. Die Proliferationsrate stieg an, der prozentuale Anteil zytotoxischer T-Zellen nahm zu, ein starker Anstieg IFN- γ sezernierender, d.h. aktivierter T-Zellen war zu verzeichnen und die Untersuchungen bezüglich CAP-1 spezifischen T-Zellrezeptors zeigten eine Zunahme antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen (4.5). Erklärbar sind die beobachteten Effekte durch ein Modell, daß dendritische Zellen durch einen Kontakt mit T-Helferzellen konditionieren läßt (5.3.2). Die derart konditionierten dendritischen Zellen bewirken dann eine klonale Expansion antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen.

5.4 Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen

Vor dem Hintergrund der in 4.5.2 gemachten Beobachtungen zur Bedeutung der MHC Klasse II-Moleküle auf dendritischen Zellen, erschien eine Transfektion mit dem CIITA-Gen zur Stimulation von T-Helferzellen sinnvoll.

5.4.1 Transfektion dendritischer Zellen

Mulders et al. beschreiben eine hohe Transfektionseffizienz bei dendritischen Zellen unter Verwendung eines AdV-PLL-Vektors (Mulders et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden, wobei eine etwas höhere MOI verwendet wurde. Die Verwendung der relativ geringen MOI von 80-100 und das Belassen des Virus für 48 Stunden auf den Zellen bewirkte keine zytopathischen Effekte. Die Bestimmung der Expression der für den adenoviralen Gentransfer benötigten Oberflächenstrukturen auf den dendritischen Zellen, ergab eine Zunahme des CA-Rezeptors und des $\alpha_v\beta_5$ -Integrins im Verlauf der Kultivierung (Abbildung 20). Korrespondierend dazu fiel die Transfektionseffizienz mit zunehmendem Alter der Zellen höher aus (Abbildung 21). Fünf Tage dendritische Zellen konnten fast zu 100% transfiziert werden. Die Transfektion bewirkte keine morphologischen Veränderungen (Abbildung 22).

In Abhängigkeit von dem Alter der dendritischen Zellen am Tag der Transfektion konnte die mRNA des CIITA-Genes nachgewiesen werden (Abbildung 23). Wie zu erwarten, konnte bei sehr jung transfizierten DC (≤ 2 Tage) keine CIITA-RNA nachgewiesen werden.

5.4.2 Eigenschaften CIITA transfizierter dendritischer Zellen

Im Gegensatz zu den von Martin et al. publizierten Ergebnissen (Martin et al., 1997), konnte keine wesentliche Veränderung der MHC Klasse I-Expression nach Transfektion mit dem CIITA-Gen beobachtet werden. Bei der MHC Klasse II-Expression konnte nach der CIITA Transfektion eine Zunahme der Expression um durchschnittlich 64,6% beobachtet werden (Tabelle 6). Das viral eingeschleuste CIITA-Gen war somit funktionell aktiv.

Nachdem dargestellt werden konnte, daß dendritische Zellen sich mittels AdV-PLL mit dem CIITA-Gen transfizieren lassen, daß das Gen in mRNA umgeschrieben wird, und daß dies letztendlich zu einer verstärkten Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche dendritischer Zellen führt, wurden die Auswirkungen dieser Transfektion auf die zytotoxizitätssteigernde Wirkung dendritischer Zellen auf kokultivierte CIK-Zellen untersucht (4.6.5). Im Zytotoxizitätstest ergab sich keine Steigerung der vermittelten Zellyse der CIK-Zellen bei Kokultur mit gepulsten dendritischen Zellen. Gravierend fiel jedoch der Unterschied zwischen CIK-Zellen, die mit ungepulsten mock-transfizierten DC kokultiviert worden waren, und solchen, die mit ungepulsten CIITA-transfizierten kokultiviert wurden. Es wurden Zellysen erreicht, die die Größenordnung der CIK-Zellen erreichten, die mit Tumorantigen gepulsten dendritischen Zellen kokultiviert worden waren, wobei starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern auffielen. Die starke unspezifische Aktivierung nach Kokultur mit CIITA-transfizierten dendritischen Zellen läßt sich möglicherweise mit dem eingangs erwähnten Modell zur T-Zellaktivierung diskutieren. Gepulste dendritische Zellen sind durch den Antigenkontakt ausreichend konditioniert für eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, wohingegen ungepulste DC erst durch einen Kontakt mit T-Helferzellen zu stimulationsfähigen APC ausdifferenzieren. Eine Erhöhung der MHC Klasse II-Expression, z.B. nach Transfektion mit dem CIITA-Gen fördert den Kontakt mit T-Helferzellen.

5.4.3 Zusammenfassung: Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen

Dendritische Zellen ließen sich erfolgreich mittels AdV-PLL transfizieren. Beim Vergleich ungepulster dendritischer Zellen mit CIITA transfizierten ungepulsten dendritischen Zellen, konnte im Zytotoxizitätstest eine starke Zunahme der lytischen Eigenschaft kokultivierter CIK-Zellen bei vorausgegangener Transfektion der dendritischen Zellen beobachtet werden. Wurden gepulste dendritische Zellen transfiziert, konnte keine relevante Zunahme beobachtet werden. Eine Transfektion dendritischer Zellen mit dem CIITA-Gen stellt somit eine Möglichkeit zur Zytotoxizitätssteigerung kokultivierter Effektorzellen dar, wenn kein Antigen zum Pulsen dendritischer Zellen zur Verfügung steht.

5.5 Ausblick

Weltweit wurden in den vergangenen Jahren klinische Studien initiiert, in deren Mittelpunkt eine Immuntherapie mit dendritischen Zellen steht. Zum Einsatz kommen dabei dendritische Zellen, die abhängig von der Erkrankung, spezifisch gepulst werden. So werden z.B. bei Patienten mit B-Zell Lymphomen mit Idiotyp-Protein gepulste DC verwendet (Hsu et al., 1996), Hölzl et al. setzen autologes Tumorzelllysate bei Patienten mit Nierenzellkarzinom zum Pulsen ein (Hölzl et al., 1998), für den klinischen Einsatz bei Patienten mit Prostatakarzinom ist ein Beladen der dendritischen Zellen mit Peptiden des Prostata-spezifischen-Membran-Antigens beschrieben (Murphy et al., 1996), weitere Studien beschäftigen sich mit dem Ovarialkarzinom (Brossart et al., 1999), dem malignem Melanom (Nestle et al., 1998) oder dem multiplen Myelom (Reichhardt et al., 1999). Insgesamt konnte aufgezeigt werden, daß ein klinischer Einsatz dendritischer Zellen durchführbar ist, mit sehr geringen Nebenwirkungen verbunden ist und keine Autoimmunität bewirkt. Ein Ansprechen auf die Behandlung wird von den meisten Arbeitsgruppen beschrieben und reicht von Stabilisierung über partielle Remission bis hin zur Remission. Begleitanalysen, wie ELISpot-Untersuchungen, *delayed-type hypersensitivity reaction* (DTH-Reaktion), Messungen der Zytokinproduktion und Zytotoxizitätstests mit peripheren Blutlymphozyten demonstrieren das Vorliegen einer Immunantwort.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt einen immuntherapeutischen Ansatz für die Behandlung gastrointestinaler Tumore auf. Autologe dendritische Zellen oder kokultivierte Effektorzellen können

als Tumorstoffe eingesetzt werden. Dendritische Zellen können hierfür mit CA 19-9, CEA oder mit dem Serum von Tumorkranken gepulst werden. Eine unspezifische Aktivierung der dendritischen Zellen durch Transfektion mit dem CIITA-Gen könnte bei Patienten mit Tumoren, für die keine Tumorstoffe beschrieben sind, erfolgversprechend sein. Eine klinische Studie zum Einsatz mit Tumorstoff gepulster autologer dendritischer Zellen beim Nierenzellkarzinom, die von unserer Arbeitsgruppe momentan durchgeführt wird, wurde von der vorliegenden Arbeit beeinflusst.

Anhang

Bibliographie

- Aicher, A.; Westermann, J.; Cayeux, S.; Willmsky, G.; Daemen, K.; Blankenstein, T.; Uckert, W.; Dörken, B. and A. Pezzutto. 1997. "Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: Feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells." *Exp. Hematol.* 25: 39-44.
- Alters, S.E.; Gadea, J.R. and R. Philip. 1997. „Immunotherapy of cancer: Generation of CEA specific CTL using CEA peptide pulsed dendritic cells.“ *Dendr. Cells Fund. Clin. Immunol.* 519-524.
- Alters, S.E.; Gadea, J.R., Sorich, M.; O'Donoghue, G.; Talib, S. and R. Philip. 1998. „Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire.“ *J. Immunother.* 21 (1): 17-26.
- Altman, J.D.; Moss, P.A.H.; Goulder, P.J.R.; Barouch, D.H.; McHeyzer-Williams, M.G.; Bell, J.I.; McMichael, A.J. and M.M. Davis. 1996. „Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 274: 94-96.
- Bakker, A.B.; Marland, G.; de Boer, A.J.; Huijbens, R.J.; Danem, E.H.; Ademan, .J. and C.G. Figdor. 1995. „Generation of anti-melanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro.“ *Cancer Res.* 55: 5330-5334.
- Bancherau, J. and R.M. Steinman. 1998. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature.* 392: 246-252.
- Barth, R.J.; Camp, B.J.; Martuscello, T.A.; Dain, B.J. and V.A. Memoli. 1996. "The cytokine micro-environment of human colon carcinoma. Lymphocyte expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 predicts improved survival." *Cancer.* 78: 1168-1178.
- Bean, P. and A. Mazumder. 1992. "Resistance of different tumor cells to lysis by lymphokine activated killer cells can be mediated by distinct mechanisms." *Immunobiology.* 185: 63-.
- Bergelson, J.M.; Cunningham, J.A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E.A.; Krithivas, A.; Hong, J.S.; Horwitz, M.S.; Crowell, R.L. and R.W. Finberg. 1997. "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science.* 275: 1320-1323.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.“ *Nucleic Acids Res.* 7 (6): 1513-1523.
- Boczkowski, D.; Nair, S.K.; Snyder, D. and E. Gilboa. 1996. "Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo." *J. Exp. Med.* 184: 465-472.
- Boon, T., Cerottini, J.C.; Van Der Bruggen, P. and A. Van Pel. 1994. "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365.
- Boss, J.M. 1997. "Regulation of transcription of MHC class II genes." *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1): 107-113.
- Bøyum, A. 1964. "Separation of white blood cells." *Nature.* 204 (793): 106-113.
- Brossart, P.; Stuhler, G.; Heinrich, K.S.; Behnke, L.; Reichardt, V.L.; Stefanovic, S.; Rammensee, H.-G.; Lanz, K. and W. Brugger. 1999. "Vaccination therapy of patients with metastatic breast and ovarian carcinoma using peptide pulsed dendritic cells." *ASCO.*
- Bubenick, J. 1996. "Gene transfer for immunotherapy of cancer." *Gene Ther.* 3: 944-945.
- Caux, C.; Vanbervliet, B.; Maasacrier, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; de Saint-Vis, B.; Jacquet, C.; Yoneda, K.; Imamura, S.; Schmitt, D. and J. Bancherau. 1996. „CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF and TNF α .“ *J. Exp. Med.* 184: 695-706.

- Cella, M.; Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1997. "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." *Curr. Op. Immunol.* 5: 10-16.
- Chang, C.H.; Guerder, S.; Hong, S.C.; van Ewijk, W. and RA Flavell. 1996. "Mice lacking CIITA show tissue-specific impairment of MHC class II expression." *Immunity.* 4 (29): 167-178.
- Cheever, M.A.; Disis, M.L.; Bernhard, H.; Gralow, J.R.; Hand, S.L.; Huseby, E.S.; Qin, H.L.; Takahashi, M. and W. Chen. 1995. "Immunity to oncogenic proteins." *Immunol. Rev.* 145: 33-59.
- Chin, K.C.; Li, G.X. and J.P.Y.Ting. 1997. "Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2501-2506.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal. Biochem.* 162 (1): 156-159.
- Cristiano, R.J.; Smith, L.C.; Kay, M.A.; Brinkley, B.R. and S.L. Woo. 1993. "Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11548-11552.
- Cook, J.A. and J.B. Mitchell. 1987. "Viability measurements in mammalian cell systems." *Anal. Biochem.* 179 (1): 1-7.
- Csipai, M.; Lefterova, P.; Finke, S.; Jonsthorpe, V.; Scheffold, C.; Huhn, D. and I.G.H. Schmidt-Wolf. 1996. "Effects of interleukin-7 on proliferation of tumor cells." *Canc. Res. Ther. Cont.* 5: 11-16.
- Denzin, L.K. and P. Creswell. 1995. "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II dimers and facilitates peptide loading." *Cell.* 82: 155-165.
- Di Nicola, M.; Siena, S.; Bregni, M.; Longoni, P.; Magni, M.; Milanese, M.; Matteucci, P.; Mortarini, R.; Anichini, A.; Parmiani, G.; Drexler, I.; Erfle, V.; Sutter, G. and A.M. Gianni. 1997. "Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia and adenovirus vectors." *Cancer Gene Ther.* 5 (6): 350-356.
- Diao, J.; Smythe, J.A.; Rowe, P.B. and I.E. Alexander. 1999. "Human PBMC-derived dendritic cells transduced with an adenovirus vector induce cytotoxic T-lymphocyte responses against a vector-encoded antigen in vitro." *Gene Ther.* 6: 845-853.
- Diebold, S.; Lehmann, H.; Kurs, M.; Wagner, E.; Cotten, M. and M. Zenke. 1999. "Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection." *Hum. Gene Ther.* 10: 775-786.
- Dietz, A.B. and S. Vuc-Pavlovic. 1998. "High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells." *Blood.* 91 (2): 392-398.
- Dityaktin, S.Y.; Lisovskaya, K.V.; Panzhava, N.N.; and B.N. Iliashenko. 1972. "Frozen-thawed bacteria as recipients of isolated coliphage DNA." *Biochem. Biophys. Acta.* 281: 319-323.
- Dranoff, G. and R.C. Mulligan. 1995. "Gene transfer as cancer therapy." *Adv. Immunol.* 58: 417-454.
- Egner, W.; McKenzie, J.L.; Smith, S.M.; Beard, M.E.J. and D.N.J.Hart. 1993. "Identification of potent mixed leucocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow." *J. Immunol.* 150: 3043-3047.
- Fanger, N.A.; Wardwell, K.; Shen, L.; Tedder, T.F. and P.M. Guyre. 1996. "Type I (CD64) and type II (CD32) FC- γ receptor mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J. Immunol.* 157: 541-545.
- Fremont, D.H.; Hendrickson, W.A.; Marrack, P. and J. Kappler. 1996. "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides." *Science.* 272: 1001-1004.
- Gabrilovich, D.; Oyama, T.; Ishida, T. and D. Carbone. 1998. "Defective dendritic cell function in cancer patients-improving the efficacy of vaccine therapy." *ASCO.* 463-466.

- Gilboa, E. and H.K. Lyerly. 1994. "Specific active immunotherapy of cancer using genetically modified tumor vaccines." *Biol. Ther. Cancer Upd.* 1-16.
- Gilboa, E.; Nair, S.K. and K. Lyerly. 1998. "Immunotherapy of cancer with dendritic cell-based vaccines." *Cancer Immunol. Immunother.* 46 (2): 82-87.
- Gold, P. and SO Freedman. 1965. "Demonstration of tumour specific antigens in human colon carcinomas by immunological tolerance and absorption techniques." *J. Exp. Med.* 121: 439-462.
- Gong, J.; Chen, L.; Kashiwaba, M.; Moanome, Y., Tanaka, T. and D. Kufe. 1997. "Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells." *Gene Ther.* 4: 1023-1028.
- Greten, T.F.; Slansky, J.E.; Kubota, R.; Soldan, S.S.; Jaffee, E.M.; Leist, T.M.; Pardoll, D.M.; Jacobson, S. and J.P. Schneck. 1998. "Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (13): 7568-7573.
- Grimm, E.A.; Mazunder, A.; Zhang, H.Z. and S.A. Rosenberg. 1982. "Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by IL-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes." *J. Exp. Med.* 155: 1823-1841.
- Haglund, C.; Roberts, P.J.; Kuusela, P.; Scheinin, T.M.; Makela, O. and H. Jalanko. 1986. "Evaluation of CA 19-9 as a serum tumour marker in pancreatic cancer." *Br. J. Cancer.* 53: 197-202.
- Hart, D.N.J. 1997. "Dendritic cells: unique leucocyte populations which control the primary immune response." *Blood.* 90 (9): 3245-3287.
- Höhl, L.; Rieser, C.; Papesh, C.; Ramoner, R.; Bartsch, G. and M. Thurnher. 1998. "CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer." *Lancet.* 352: 1358.
- Hsu, F.J.; Benike, C.; Fagnoni, F.; Liles, T.M.; Czerwinski, D.; Taidi, B.; Engleman E.G. and R. Levy. 1996. "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." *Nature Med.* 2 (1): 52-57.
- Inaba, K.; Metlay, J.P.; Crowley, M.T. and R.M. Steinman. 1990. "Dendritic cells pulsed with protein antigen in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." *J. Exp. Med.* 172: 631-640.
- Inaba, K.; Inaba, M.; Romani, N.; Hideki, A.; Deguchi, M.; Ikehara, S.; Muramatsu, S. and R.M. Steinman. 1992. "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with GM-CSF." *J. Exp. Med.* 176: 1693-1698.
- Inaba, K.; Young, J.W. and R.M. Steinman. 1987. "Direct activation of CD8+ lymphocytes by dendritic cells." *J. Exp. Med.* 166: 182-194.
- Jill, F.A.; Butterfield, L.H.; Roth, M.D.; Bui, L.A.; Kiertscher, S.M.; Lau, R.; Dubinett, S.; Glaspy, J.; McBride, W.H. and J.S. Economou. 1997. "A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells." *Cancer Gene Ther.* 4 (1): 17-25.
- Kemmner, W.; Schlag, P. and R. Brossmer. 1987. "A rapid and simple procedure for dissociation of tumor tissue from the human colon." *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (4): 400-401.
- Lanier, L.L.; Le, A.M.; Calvin, C.I.; Loken, M.R. and J.H. Philips. 1986. "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J. Immunol.* 136: 4480-4486.
- Lanzavecchia, A. 1998. "Licence to kill." *Nature.* 393: 413-414.

- Lee, P.P.; Yee, C.; Savage, P.A.; Fong, L.; Brockstedt, D.; Weber, J.S.; Johnson, D.; Swetter, S.; Thompson, J.; Greenberg, P.D.; Roedere, M. and M.M. Davis. 1999. "*Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.*" *Nature Med.* 5 (6): 677-685.
- Lotze, M.T.; Strausser, J.L. and S.A. Rosenberg. 1980. "The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells-grown in T cell growth factor (TCGF) Implications for the adoptive immunotherapy of tumors." *J. Immunol.* 125: 1487-1493.
- Low, M.G. and A.R.S. Prasad. 1988. "A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. 85: 980-984.
- Lu, P.H. and R.S. Negrin. 1994. "A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with SCID." *J. Immunol.* 153 (4): 1687-1696.
- Mackiewicz, A. and S. Rose-John. 1998. "More about genetically modified tumour vaccines." *Gene Ther.* 5: 147-148.
- Maeurer, M.J.; Gollin, S.M.; Martin, D.; Swaney, W.; Bryant, J.; Castelli, C.; Robbins, P.; Parmiani, G.; Storkus, W.J. and M.T. Lotze. 1996. "Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen." *J. Clin. Invest.* 98: 1633-1641.
- Margolin, K.A.; Negrin, R.S.; Wong, K.K.; Chatterjee, S.; Wright, C. and S.J. Forman. 1997. "Cellular immunotherapy and autologous transplantation for hematologic malignancy." *Imm. Rev.* 157: 231-240.
- Martin, B.K.; Keh-Chuang, C.; Olsen, J.C.; Skinner C.A.; Dey, A.; Ozata, K. and J.P.Y. Ting. 1997. "Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA." *Immunity.* 6: 591-600.
- Moore, K.W.; O'Garra, A.; Vieira, P. and T.R. Mosman. 1993. "Interleukin-10." *Annu. Rev. Immunol.* 11: 165-190.
- Morel, A.; Quarantino, S.; Douek, D.C. and M. Londei. 1997. "Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step." *Eur. J. Immunol.* 27: 26-31.
- Mulders, P.; Pang, S.; Dannull, J.; Kaboo, R.; Hinkel, A.; Michel, K.; Tso, C.; Roth, M. and A. Bell-degrun. 1998. "Highly efficient and consistent gene transfer into dendritic cells utilizing a combination of ultraviolet-irradiated adenovirus and Poly(L)-Lysine conjugates." *Cancer Res.* 58: 956-961.
- Mule, J.J.; Schwarz, S.L. and S.A. Rosenberg. 1984. "Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK-cells and recombinant IL 2." *Science.* 225: 1487-1489.
- Murphy, G.; Tjoa, B.; Ragde, H.; Kenny, G. and A. Boynton. 1996. "Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201 specific peptides from prostate-specific membrane antigen." *Prostate.* 29: 371-380.
- Nair, S.; Rouse, B.T.; Snyder, D. and E. Gilboa. 1997. "Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen presenting cells pulsed with tumor extracts." *Cancer.* 70: 706-715.
- Natali, P.G.; Nicotra, M.R.; Bigotti, A.; Venturo, I.; Marcenaro, L.; Giacomini, P. and C. Russo. 1989. "Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6719-6723.
- Nestle, F.O.; Alijagic, S.; Gilliet, M.; Sun, Y.; Grabbe, S.; Dummer, R.; Burg, G. and D. Schadendorf. 1998. "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nature Med.* 4 (3): 328-332.

- Öbrink, B. 1997. "CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties." *Curr. Opin. Cell. Biol.* 616-626.
- Parmiani, G. 1993. "Tumor immunity as auto immunity: Tumor antigens include normal self-proteins which stimulate anergic peripheral T cells." *Immunol. Today.* 14: 536-538.
- Peiper, M.; Goedegebuure, P.S. and T.J. Eberlein. 1997. „Generation of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes using allogenic dendritic cells capable of lysing human pancreatic cancer cells." *Surgery.* 122 (2): 235-242.
- Philip, R.; Brunette, E.; Ashton, J.; Alters, S.; Gadea, J.; Sorich, M.; Yau, J.; O'Donoghue, G.; Lebkowski, J.; Okarma, T. and M. Philip. 1997. „Transgene expression in dendritic cells to induce antigen-specific cytotoxic T cells in healthy donors." *Cancer Gene Ther.* 5 (4): 236-246
- Reichhardt, V.L.; Okada, C.Y.; Liso, A.; Benike, C.J.; Stockerl-Goldstein, K.E.; Engleman, E.G.; Blume, K.G. and R. Levy. 1999. „Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma-a feasibility study." *Blood.* 93 (7): 2411-2419.
- Ridge, J.P.; Di Rosa, F. and P. Matzinger. 1998. "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature.* 393: 474-477.
- Romani, N.; Gruner, S.; Brang, D.; Kämpgen, E.; Lenz, A.; Trockenbacher, B.; Konwalinka, G.; Fritsch, P.O.; Steinman, R.M. and G. Schuler. 1994 „Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *J. Exp. Med.* 180: 83-93.
- Romani, N.; Reider, D.; Heuer, M.; Ebner, S.; Kampgen, E.; Eibl, B.; Niederwieser, D. and G.S.O. Schuler. 1996. "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." *Immunol. Methods.* 196 (2): 137-151.
- Rosenberg, S.A.; Spiess, P.S. and R. Lafreniere. 1986. "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes." *Science.* 233: 1318-1321.
- Rosenberg, S.A. 1992. "The immunotherapy and gene therapy of cancer." *J. Clin. Oncol.* 10: 180-199.
- Rosenberg, S.A.; Kawakami, Y.; Robbins, P.F. and R.F. Wang. 1996. "Identification of the genes encoding cancer antigens: implications for cancer immunotherapy." *Adv. Cancer Res.* 10: 145-177.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha." *J. Exp. Med.* 179: 1109-1114.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994b. „Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products." *J. Exp. Med.* 182: 389-400.
- Saraya, K. and C.D.L. Reid. 1996. "Stem cell factor and the regulation of dendritic cell production from CD34+ progenitors in bone marrow and cord blood." *Br. J. Haematol.* 93: 258-264.
- Schlom, J. 1995. "Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine." *J. Natl. Canc. Inst.* 87: 982-990.
- Schmidt, R.E.; Murray, C.; Daley, J.F.; Schlossman, S.F. and J. Ritz. 1986. "A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype." *J. Exp. Med.* 164: 351-357.
- Schmidt-Wolf, I.G.H.; Negrin, R.S.; Kiem, H.P.; Blume, K.G. and I.L. Weissmann. 1991. "Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine induced killer cells with potent anti-tumor cell activity." *J. Exp. Med.* 174: 139-149.

- Schmidt-Wolf, I.G.H.; Lefterova, P.; Mehta, B.A.; Fernandez, L.P.; Huhn, D.; Blume, K.G.; Weissmann, I.L. and R. Negrin. 1993. "Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor recognition of cytokine-induced killer cells." *Exp. Hematol.* 21: 1673-1679.
- Schmidt-Wolf, I.G.H., Lefterova, P.; Johnston, V.; Neubauer, A.; Huhn, D.; Negrin, R. and K.G.Blume. 1994. "Propagation of T cells with NK cell marker." *Br. J. Haematol.* 87: 453-458.
- Schmidt-Wolf, I.G.H.; Neubauer, A.; Finke, S.; Csipai, M.; Wittig, B. and D. Huhn. 1994b. "Interleukin-7 gene therapy for patients with metastatic colon cancer, renal cell cancer, malignant melanoma or lymphoma." *Hum. Gene Ther.* 5: 1161-1169.
- Schmoll, H.J.; Höffken, K. und K. Possinger. 1997. "Kompendium Internistische Onkologie." 694-759; 810-830.
- Schuler, G. and R.M. Steinman. 1997. "Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors." *J. Exp. Med.* 186 (8): 1183-1187.
- Seleznick, M.J. 1992. "Tumor markers." *Prim. Care.* 19 (4): 715-726.
- Sherman, M.A.; Weber, D.A. and P.E. Jensen. "DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide." *Immunity.* 3: 197-205.
- Steimle, V.; Otten, L.A.; Zufferey, M. and B. Mach. 1993. "Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)." *Cell.* 75 (1): 135-146.
- Steinman, R.M. and Z.A. Cohn. 1972. "The uptake, distribution and fate of soluble horseradish peroxidase in mouse peritoneal macrophages in vitro." *J. Cell. Biol.* 55: 186-204.
- Steinman, R.M. and Z.A. Cohn. 1973. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice." *J. Exp. Med.* 137: 1142-1147.
- Steinman, R.M. 1991. "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-296.
- Szabolcs, P.; Gallardo, H.F.; Ciocon, D.H.; Sadelain, M. and J.W. Young. 1997. "Retrovirally transduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T-cell stimulatory capacity." *Blood.* 90 (6): 2160-2167.
- Tarte, K.; Lu, Z.Y.; Fiol, G.; Legouffe, E.; Rossi, J.F. and B. Klein. 1997. "Generation of virtually pure and potentially proliferating dendritic cells from non-CD34 apheresis cells from patients with multiple myeloma." *Blood.* 90 (9): 3482-3495.
- Tendeloo, V.F.I. van; Snoeck, H.W.; Lardon, F.; Vanham, G.L.E.E.; Nijs, G.; Lenjou, M.; Hendriks, L.; Broeckhoven, C. van; Mouljin, A.; Rodrigus, I.; Verdonk, P.; Bockstaele, D.R. van and Z.N. Berneman. 1998. "Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells." *Gene Ther.* 5: 700-707.
- Toribara, N.H. and M.H. Sleisinger. 1995. "Screening for colorectal cancer." *N. Engl. J. Med.* 332: 861-867.
- Van Der Bruggen, P.; Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; De Plaen, E.; Van Den Eyde, B.; Knuth, A. and T. Boon. 1991. "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science.* 254: 1643-1647.
- Van Pel, A. and T. Boon. 1982. "Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4718-4722.
- Versteegen, J.M.; Logtenberg, T. and R.E. Ballieux. 1998. "Enumeration of IFN-gamma-producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing lymphocytes at the single-cell level." *J. Immunol. Methods.* 111 (1): 25-29.

- Westermann, J.; Aicher, A.; Qin, Z.; Daemen, K.; Blankenstein, T.; Dörken, B. and A. Pezzutto. 1998. "Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation." *Gene Ther.* 1998. 5: 264-271.
- Wickham, T.J.; Mathias, P. and D. Cheresch. 1993. "Integrins $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment." *Cell.* 73: 309-319.
- Wong, C.; Morse, M. and S.K. Nair. 1997. „Induction of primary human antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using dendritic cells pulsed with peptides." *J. Immunother.* 21 (1): 32-40.
- Wood, G.S.; Freudenthal, P.S.; Edinger, A.; Steinman R.M. and R.A. Warnke. 1991. "CD45 epitope mapping of human CD1+ dendritic cells and peripheral blood dendritic cells." *Am. J. Pathol.* 138: 1451-1456.
- Yeatman, T.J.; Duan, C.; Mao, W.; Karl, R.C. and J.Y. Djeu. 1995. "Augmentation of carcinoembryonic antigen release from intact, viable tumor cells by a factor in human serum." *Ann. Surg. Oncol.* 2 (4): 336-342.
- Zhang, W. 1999. "Development and application of adenoviral vectors for gene therapy and cancer." *Cancer Gene Ther.* 6 (2): 113-138.
- Zoll, B.; Lefterova, P.; Csipai, M.; Finke, S.; Trojanek, B.; Ebert, O.; Micka, B.; Roigk, K.; Fehlinger, M.; Schmidt-Wolf, G.D.; Huhn, D. and I.G. Schmidt-Wolf. 1998. "Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12." *Cancer Immunol. Immunother.* 47 (4): 221-226.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MERKMALE DENDRITISCHER ZELLEN	3
ABBILDUNG 2: VEKTORKARTE DES PCR2.1-TOPO-HSCIITA	12
ABBILDUNG 3: DENDRITISCHE ZELLEN AN TAG +6 DER KULTIVIERUNG (FOTOGRAFIERT BEI 400FACHER VERGRÖßERUNG)	20
ABBILDUNG 4: DURCHFLUßZYTOMETRISCHE DARSTELLUNG DENDRITISCHER ZELLEN (TAG +5)	20
ABBILDUNG 5: ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON CIK-LYMPHOZYTEN GEGEN PANKREASKARZINOMZELLEN (DAN-G) NACH COKULTIVIERUNG MIT CA 19-9-PROTEIN GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN	23
ABBILDUNG 6: ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON CIK-LYMPHOZYTEN GEGEN DAN-G ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT DC, DIE MIT STEIGENDEN CA 19-9 PROTEINKONZENTRATIONEN GEPULST WURDEN	23
ABBILDUNG 7: ZYTOTOXIZITÄT VON CIK-ZELLEN GEGEN COLO 201 ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT CEA GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN	24
ABBILDUNG 8: ZYTOTOXIZITÄT VON CIK-ZELLEN GEGEN 293 ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT CEA GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN	25
ABBILDUNG 9: BLOCKADE VON CA 19-9 AUF DAN-G ZELLEN ZUM NACHWEIS EINER SPEZIFISCHEN AKTIVIERUNG MIT GEPULSTEN DC COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN	25
ABBILDUNG 10: EINFLUß TUMORMARKERHALTIGEN SERUMS BEI DER KULTIVIERUNG VON DC AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN GEGEN COLO 205 ZELLEN	27
ABBILDUNG 11: ZYTOTOXIZITÄT COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN GEGEN DAN-G ZELLEN NACH TITRATION TUMORMARKERHALTIGEN SERUMS BEI DER KULTIVIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN (EFFEKTOR ZU TARGET VERHÄLTNIS 10:1)	28
ABBILDUNG 12: EINFLUß EINER SERUMHITZEINAKTIVIERUNG AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN VON PATIENTEN MIT PANKREASKARZINOM GEGEN DAN-G ZELLEN NACH KULTIVIERUNG AUTOLOGER DENDRITISCHER ZELLEN IN TUMORMARKERHALTIGEN SERUM	29
ABBILDUNG 13: ZYTOTOXIZITÄT COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN GEGEN COLO 201 ZELLEN, NACH ZUSÄTZLICHEM PULSEN DER DC MIT EXOGENEM CEA UND KULTIVIERUNG IN SERUM VON PATIENTEN MIT CRC	31
ABBILDUNG 14: ZYTOTOXIZITÄT VON CIK-ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT CA 19-9 GEPULSTEN AUTOLOGEN DENDRITISCHEN ZELLEN GEGEN AUTOLOGE TUMORZELLEN VON PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM	32
ABBILDUNG 15: ZYTOTOXIZITÄT VON CIK-ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT CEA GEPULSTEN AUTOLOGEN DENDRITISCHEN ZELLEN GEGEN AUTOLOGE TUMORZELLEN VON PATIENTEN MIT CRC	33
ABBILDUNG 16: EINFLUß EINER COKULTIVIERUNG MIT DC AUF DEN QUOTIENTEN $CD8^+CD3^+/CD4^+CD3^+$ BEI CIK-ZELLEN	34
ABBILDUNG 17: BLOCKADE DER MHC-EXPRESSION AUF DC DURCH ANTIKÖRPERZUGABE AN VERSCHIEDENEN TAGEN. COKULTIVIERTE CIK-ZELLEN WURDEN IM ZYTOTOXIZITÄTSTEST IN EINEM 20FACHEN ÜBERSCHUß GEGEN COLO 205 ZELLEN EINGESETZT	35
ABBILDUNG 18: DURCHFLUßZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER T-ZELLREZEPTORSPEZIFITÄT MIT GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN COKULTIVIERTER CIK-ZELLEN. ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN, MIT DEM PHÄNOTYP $CD8^+$ WURDEN DURCH FITC-FÄRBUNG ERMITTELT. ES WURDE DIE IN ‚A‘ ISOLIERTE LYMPHOZYTENPOPULATION UNTERSUCHT. DAS RECHTE BILD IN DER ERSTEN ZEILE ENTSPRICHT DEM NULLWERT UND ZEIGT CIK-ZELLEN NACH COKULTIVIERUNG MIT CAP-1 GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN. BESTIMMT WURDE DIE EXPRESSION DES T-ZELLREZEPTORS FÜR EIN IRRELEVANTES PEPTID (HIER PEP _{CD19}). IM LINKEN BILD DER ZWEITEN ZEILE WERDEN CIK-ZELLEN NACH COKULTUR MIT CEA-PROTEIN GEPULSTEN DC GEZEIGT, BESTIMMT WURDE DER ANTEIL SPEZIFISCHER CAP-1 T-ZELLREZEPTOREN. DAS RECHTE BILD IN DER ZWEITEN ZEILE ZEIGT CAP-1 SPEZIFISCHE T-ZELLREZEPTOREN AUF CIK-ZELLEN NACH COKULTUR MIT CEA-PEPTID (CAP-1) GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN.	36
ABBILDUNG 19: NITROZELLULOSEMEMBRAN MIT IFN- γ SPOTS	38
ABBILDUNG 20: EXPRESSION VON INTEGRIN UND CAR AUF DENDRITISCHEN ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER DER DC	39
ABBILDUNG 21: EFFIZIENZ DER ADENOVIRALEN TRANSFEKTION DENDRITISCHER ZELLEN. MIT DEM LACZ-GEN TRANSFIZIERTE ZELLEN WURDEN DURCH BLAUFÄRBUNG NACH X-GAL ZUGABE DETEKTIERT	40
ABBILDUNG 22: FÜNF TAGE ALTE DENDRITISCHE ZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT DEM LACZ-GEN UND ANFÄRBUNG POSITIVER ZELLEN DURCH ZUGABE VON X-GAL (FOTOGRAFIERT BEI 100 \times VERGRÖßERUNG)	40
ABBILDUNG 23: AGAROSEGEL NACH RT-PCR ZUM NACHWEIS VON CIITA-RNA IN CIITA-TRANSFIZIERTEN DC (TRANSFEKTION AN TAG +5)	41

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMARKERN AUF DENDRITISCHEN ZELLEN	21
TABELLE 2: EXPRESSION VON TUMORANTIGENEN	22
TABELLE 3: TUMORMARKERHALTIGES SERUM IN EINER ENDKONZENTRATION VON 100 U/ML CA 19-9 IM KULTIVIERUNGSMEDIUM VON DC. GEMESSEN WURDE DIE ZYTOTOXIZITÄT VON COKULTIVIERTEN CIK-ZELLEN GEGEN CA 19-9 POSITIVE TARGETZELLEN. ANGEZEIGT IST DIE PROZENTUALE TARGET-ZELLYSE.	30
TABELLE 4: ANTEIL DER CIK-ZELLEN MIT PEPTIDSPEZIFISCHEN T-ZELLREZEPTOR AN DER LYMPHOZYTEN-SUBPOPULATION NACH COKULTUR MIT GEPULSTEN DENDRITISCHEN ZELLEN. DIE IN KLAMMERN ANGE- GEBENEN ZAHLEN ENTSPRECHEN DER EXPRESSION NACH SUBTRAKTION DER KONTROLLMESSUNG. DIE DATEN ZEIGEN DIE MITTELWERTE VON ZWEI VONEINANDER UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN.	37
TABELLE 5: NACHWEIS IFN- γ PRODUZIERENDER CIK-ZELLEN IM ELISPOT	38
TABELLE 6: EXPRESSIONSMUSTER VON MHC-MOLEKÜLEN AUF CIITA TRANSFIZIERTEN DENDRITISCHEN ZELLEN	42
TABELLE 7: AUSWAHL AN CD-ANTIGENEN	63
TABELLE 8: AUSWAHL AN ZYTOKINEN	64

Abkürzungsverzeichnis

AdV-PLL	UV inaktiverter Adenovirus, kovalent mit Poly-L-Lysin gekoppelt
APC	Antigen Presenting Cells, Antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
CA 19-9	Cancer Associated Antigen
CAR	Coxsackievirusrezeptor
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster, CD ⁺ kennzeichnet merkmalexprimierende Zellen
cDNA	Complementary Deoxyribonucleinacid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonic Antigen, Karzinoembryonales Antigen
CIK-Zellen	Cytokine-Induced Killer cells, Zytokin-induzierte Killerzellen
CRC	Colorectal Cancer, Kolorektales Karzinom
DC	Dendritic Cells, Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinacid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
FITC / PE	Fluorisoithiocyanat / Phycoerythrin
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor, Granulozyten/Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
HBS	HEPES Buffered Saline

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HLA	Human leucocyte Antigen, Humanes Leukozytenantigen
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule, Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Gamma-Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin-
LAK-Zellen	Lymphokine-Activated Killer cells, Lymphokinaktivierte Killerzellen
LB-Medium	L-Broth Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Leucocyte Function-associated Antigen-1
kb	Kilobasen
mAK	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	Multiplicity Of Infection
NK-Zellen	Natural Killer cells, Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinacid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reversed Transcription-Polymerase Chain Reaction;
SCID	Severe Combined Immuno Deficiency, Schwerer kombinierter Immundefekt
TAP	Transporters associated with Antigen Processing
TCR	T-Cell Receptor, T-Zellrezeptor
TILs	Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Tumorerinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha, Tumornekrosefaktor-alpha

Tabelle 7: Auswahl an CD-Antigenen

CD-Antigen	Antigenexprimierende Zellen (Auswahl)	Funktion
CD1a	Dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, corticale Thymozyten	Antigenpräsentation, MHC Klasse I ähnliches Molekül
CD2	T-Zellen, NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD3	T-Zellen, Thymozyten	Assoziiert mit dem T-Zellrezeptor, notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des T-Zellrezeptors
CD4	T-Helferzellen, inflammatorische T-Zellen	Corezeptor für MHC Klasse II Moleküle
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC Klasse I-Moleküle
CD11a (LFA-1)	Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	Untereinheit des Integrins LFA-1, bindet an ICAM-1 (CD54)
CD14	Myelomonozytische Zellen	Rezeptor für Lipopolysaccharide
CD16	NK-Zellen, neutrophile Zellen	Vermittelt antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
CD28	Untergruppen von T-Zellen, aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen, Rezeptor für costimulatorisches Signal CD80
CD32	Monozyten, Granulozyten, B-Zellen	Niedrigaffiner Fc-Rezeptor
CD34	Hämatopoietische Vorläuferzellen	Stammzelle
CD40	Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen	Rezeptor für costimulatorische Signale, fördert Zytokinproduktion bei DC
CD40L	Aktivierte CD4-Zellen	Ligand für CD40
CD54 (ICAM-1)	Hämatopoetische und nichthämatopoetische Zellen	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD64	Monozyten, Makrophagen	Hochaffiner IgG-Rezeptor, Festhalten von Antigenen
CD66e	Adultes Kolonendothel, Kolonkarzinom	Unbekannt
CD80	Dendritische Zellen, Untergruppe von B-Zellen	Costimulator, Ligand für CD28
CD83	Dendritische Zellen	Unbekannt
CD86	Dendritische Zellen, Monozyten, aktivierte B-Zellen	Costimulator
CD152 (CTLA-4)	Aktivierte T-Zellen	Ligand für CD40, induziert Proliferation und Aktivierung von B-Zellen

Tabelle 8: Auswahl an Zytokinen

Zytokin	Produzierende Zellen	Wirkung
Interleukin-1 β	Makrophagen, Epithelzellen	Fieber, T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung
Interleukin-2	T-Zellen	T-Zellproliferation
Interleukin-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, <i>in vitro</i> Unterdrückung der Monozytenentwicklung
Interleukin-7	Knochenmarkstroma	Wachstum von Prä B- und Prä T-Zellen
Interleukin-10	T-Zellen, Makrophagen, Epstein-Barr-Virus	wirksamer Inhibitor für Makrophagenfunktionen
Interleukin-12	B-Zellen, Makrophagen	aktiviert NK-Zellen
Granulozyten/Makrophagen Koloniestimulierender Faktor	Makrophagen, T-Zellen	stimuliert Wachstum und Differenzierung der myelomonozytischen Linie
Interferon-gamma	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, Erhöhung der MHC-Expression
Tumor Nekrose Faktor-alpha	Makrophagen, NK-Zellen	Lokale Entzündungen, Endothelaktivierung
Transforming growth factor- β	Monozyten, T-Zellen	hemmt das Zellwachstum, entzündungshemmend

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angela Märten
geboren am: 20.03.1968 in Berlin
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

Schulabschluß: Juli 1987 Abitur an der Anna-Freud-Oberschule, Berlin

Ausbildung: April 1989 - März 1992 Ausbildung zur examinierten Krankenschwester am Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Berlin

Studium
Oktober 1993 – März 1997 Studium der Biotechnologie an der Technischen Fachhochschule Berlin
September 1996 – März 1997 Diplomarbeit am Immunbiologischen Institut der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mühlradt
Thema: "Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Monozyten/Makrophagen durch Lipopeptid aus Mycoplasmen"
Abschluß : Diplom-Ingenieur (FH), Endnote ‚sehr gut‘

Tätigkeiten

April 1992 – September 1997 als Krankenschwester im Bereich Knochenmarktransplantation und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Berlin

Seit Oktober 1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Immun- und gentherapeutischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmidt-Wolf, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik I, Allgemeine Innere Medizin, Bonn

Lüftelberg, den 31.12.1999

Publikationsliste

1. Sacht, G.; Märten, A.; Deiters, U.; Süßmuth, R.; Jung, G.; Wingender, E. and P.F. Mühlrad. 1998. „Activation of nuclear factor- κ B in macrophages by mycoplasmal lipopeptides.“ Eur J Immunol. 28: 4207-4212
2. Märten, A.; Schöttker, B.; Ziske, C.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Huhn, D.; Sauerbruch, T. and I.G. Schmidt-Wolf. „Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA 19-9 protein.“ In Druck, J Immunother.
3. Lefterova, P.; Märten, A.; Buttgereit, P.; Weineck, S.; Micka, B.; Scheffold, C.; Huhn, D. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Use of a bispecific anti-CD3xCD19 antibody for targeting of CD3+CD56+ human cytotoxic cells against CD19+ leukemia and lymphoma cells.“ In Druck, Cancer Res Ther Contr.
4. Lefterova, P.; Märten, A.; Buttgereit, P.; Weineck, S.; Huhn, D.; Scheffold, C. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Targeting of NK-like T immunologic effector cells against leukemia and lymphoma cells by reverse antibody dependent cellular cytotoxicity.“ In Druck, J Immunother.
5. Ebert, O.; Röpke, G.; Märten, A.; Lefterova, P.; Micka, B.; Buttgereit, P.; Niemitz, S.; Trojanek, B.; Schmidt-Wolf, G.; Huhn, D.; Wittig, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „TNF-alpha secretion and apoptosis of lymphocytes mediated by gene transfer.“ In Druck, Cytok Cell Mol Ther.
6. Märten, A.; Ziske, C.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Schakowski, F.; Klingmüller, D.; von Rücker, A.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with serum derived from pancreatic cancer patients.“ (eingereicht, Eur J Cancer).
7. Märten, A.; Ziske, C.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Lefterova, P.; Klingmüller, D.; von Rücker, A.; Scheffold, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Priming of NK-like T lymphocytes by addition of dendritic cells pulsed with CEA protein and patient serum containing CEA.“ (eingereicht, Immunology).
8. Märten, A.; Ziske, C.; Schöttker, B.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Schakowski, F.; von Rücker, A.; Scheffold, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „NK-Like T lymphocytes directly trigger dendritic cells (DC): Activation of DC and increase of DC specific, co-stimulatory molecules and MHC class II markers on DC surface by co-culturing of DC with NK-like T-cells.“ (eingereicht, J. Immunol).
9. Buttgereit, P.; Weineck, S.; Röpke, G.; Märten, A.; Micka, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors.“ (eingereicht, Cancer Gene Ther).
10. Röpke, G.; Ebert, O.; Märten, A.; Lefterova, P.; Micka, B.; Buttgereit, P.; Finke, S.; Trojanek, B.; Schmidt-Wolf, G.; von Rücker, A.; Huhn, D.; Wittig, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Increase in proliferation rate and normalization of TNF-alpha secretion by blockage of gene transfer induced apoptosis using low dose cyclosporine.“ (eingereicht, Cancer Gene Ther).
11. Schmidt-Wolf, I.; Märten, A.; Weineck, S.; Lefterova, P.; Niemitz, S.; Wittig, B. and D. Huhn. „Interleukin-7, GM-CSF and immunostimulatory oligonucleotide transfected tumour cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic cancer.“ (eingereicht, JBC).
12. Ziske, C.; Märten, A.; Schöttker, B.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Schakowski, F.; Gorschlüter, M.; von Rücker, A.; Scheffold, C.; Chao, N.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „DC directly trigger NK-like T lymphocytes: Reversal of resistance of pancreatic carcinoma cells by co-culturing of NK-like T cells with DC pulsed with tumor derived RNA and CA 19-9.“ (eingereicht, J Exp Med).
13. Märten, A.; Ziske, C.; Schöttker, B.; Weineck, S.; Buttgereit, P.; Schakowski, F.; von Rücker, A.; Scheffold, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Transduction of dendritic cells (DC) with the CIITA gene: Increase of immunostimulatory activity of DC.“ (eingereicht)

14. Buttgereit, P.; Märten, A.; Schakowski, F.; Weineck, S.; Brand, K.; Heinicke, T.; Huhn, D. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „P53 gene transfer into lymphoma cells: Induction of apoptosis and increase in sensitivity against immunologic effector cells.“ (eingereicht)

Posterbeiträge

1. Röpke, G.; Ebert, O.; Märten, A.; Lefterova, P.; Finke, S.; Trojaneck, B.; Wagner, E.; Kirchels, R.; von Rücker, A.; Huhn, D.; Schriever, F.; Wittig, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Lymphocyte apoptosis induced by gene transfer techniques.“ Jahrestagung der DGHO, Frankfurt, 1998.
2. Märten, A.; Roigk, K. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Dendritic cells pulsed with CEA protein induce CEA-specific CIK cells.“ Jahrestagung der DGHO, Frankfurt, 1998.
3. Röpke, G.; Ebert, O.; Märten, A.; Lefterova, P.; Finke, S.; Trojaneck, B.; Wagner, E.; Kirchels, R.; von Rücker, A.; Huhn, D.; Wittig, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Lymphocyte apoptosis induced by gene transfer techniques: Blockage of apoptosis induction.“ ASH, Miami, 1998.
4. Lefterova, P.; Märten, A.; Buttgereit, P.; Weineck, S.; Huhn, S. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Targeting of CD3+CD56+ human immunologic effector cells against CD19+ leukemia and lymphoma cells by the use of anti.CD3 monoclonal antibody.“ ASH, Miami, 1998.
5. Märten, A.; Ziske, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Steigerung der immunstimulierenden Wirkung von dendritischen Zellen durch Pulsen mit Seren von Patienten mit Kolorektalem Karzinom.“ AGO-Winterkurs, Bonn, 1999.
6. Märten, A.; Schöttker, B.; Ziske, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Steigerung der immunstimulierenden Wirkung von dendritischen Zellen durch Pulsen mit Seren von Patienten mit Kolorektalem Karzinom.“ DGVS, Leipzig, 1999.
7. Märten, A.; Schöttker, B.; Ziske, C.; Sauerbruch, T. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with colorectal cancer patient derived serum.“ DGHO und ÖGHO, Jena, 1999.
8. Röpke, G.; Ebert, O.; Märten, A.; Lefterova, P.; Micka, B.; Buttgereit, P.; Finke, S.; Trojaneck, B.; Schmidt-Wolf, G.; von Rücker, A.; Huhn, D.; Wittig, B. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Increase in proliferation rate and normalization of TNF-alpha secretion by blockage of gene transfer induced apoptosis using low dose cyclosporine A.“ DGHO und ÖGHO, Jena, 1999.
9. Buttgereit, P.; Weineck, S.; Röpke, G.; Märten, A.; Brand, K.; Heinicke, T.; Caselmann, W.; Huhn, D. and I.G.H. Schmidt-Wolf. „Effizienter Gentransfer in Lymphomzellen mittels adenoviraler Vektoren in Kombination mit Lipofektion.“ 3. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Gentherapie, Reissensburg, 1999.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Lüftelberg, den 31.12.1999 Angela Märten